

***Candida albicans* telepmorfológiai mutánsok szomatikus
hibridizációja, molekuláris biológiai jellemzése és
patogenitásvizsgálata**

Novák Anita

Témavezető: Dr. Pesti Miklós

Pécsi Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Biológiai Intézet
Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék
2002

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke

1. Bevezetés

- 1.1. Általános bevezetés
- 1.2. A *Candida albicans* rendszertani besorolása
- 1.3. A *Candida albicans* megjelenési formái, dimorfizmus
- 1.4. A morfogenezis jelensége a *Candida albicans*nál
- 1.5. A switching jelensége a *Candida albicans*nál
- 1.6. A *Candida albicans* virulencia faktorai

2. Célkitűzés

3. Anyagok, módszerek

- 3.1. Felhasznált törzsek
 - 3.1.1. Törzsfenntartás
- 3.2. Primerek
- 3.3. Vegyszerek, reagensek, pufferek
 - 3.3.1. Vegyszerek
 - 3.3.2. Pufferek
 - 3.3.3. Táptalajok
- 3.4. Protoplasztképzés és fúzió
- 3.5. Szegregáció
- 3.6. Pásztázó elektron mikroszkópos felvételek
- 3.7. DNS mennyiségi meghatározás flow citométerrel
- 3.8. Izoenzim vizsgálat
- 3.9. Kötődés akrilátfelszínhez
- 3.10. Patogenitásvizsgálat egérben
- 3.11. RAPD-PCR vizsgálat
- 3.12. SDS-PAGE vizsgálat
- 3.13. Kariotipizálás

4. Eredmények és értékelés

4.1. Protoplasztképzés és fúzió

4.2. Szegregáció

4.2.1. Spontán szegregáció

4.2.2. MIC érték meghatározása

4.2.3. Indukált szegregáció

4.3. Pásztázó elektronmikroszkópos képek

4.4. DNS mennyiségi meghatározás flow citométerrel

4.5. Izoenzim vizsgálat

4.6. Kötődés akrilátfelszínhez

4.7. Patogenitásvizsgálat egérben

4.8. RAPD-PCR vizsgálat

4.9. SDS-PAGE mintázat

4.10. Kariotipizálás

Összefoglalás

Köszönetnyilvánítás

Hivatkozások

Publikációs lista

Függelék

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani professzor Pesti Miklósnak a tanulmányaim során nyújtott tanácsokért és bátorításáért.

Köszönettel tartozom Czakóné Dr. Vér Klárának a munkámhoz nyújtott segítségért és tanácsaiért.

Köszönetemet szeretném kifejezni Palotai Évának és Boross Csabánénak a technikai segítségért.

Végül köszönöm a segítséget az Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék többi kollégájának, a Debreceni Egyetem Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszékén Dr. Lenkey Bélának, a Szegedi Egyetem Mikrobiológiai Tanszékén Dr. Vágvölgyi Csabának, a Pécsi Tudományegyetem Orvosi Mikrobiológiai és Immunológiai Intézetében Dr. Emődy Leventének és Dr. Pál Tibornak, valamint a Ljubljana-i Egyetem Biotechnológiai Tanszékén Dr. Peter Raspornak.

Rövidítések

NTG	
ade ⁻	adenin auxotrófia
Lys ⁻	Lizin auxotrófia
Met ⁻	Metionin auxotrófia
SEM	Pásztázó elektron mikroszkóp
OsO ₄	Ozmium-teraoxid
G6PD	Glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz
MD	Malát dehidrogenáz
CAT	Kataláz
GD	Glutamát dehidrogenáz
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil-etiléndiamin
PER	Ammónium-perszulfát
PMSF	Fenazin-metoszulfát
NBT	p-nitro-tetrazóliumkék
NAD	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADP	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
EDTA	Etiléndiamin-tetraecetsav
TE	Trisz/EDTA puffer
TAE	Trisz/acetát puffer
LETS	
SDS	Nátrium-dodecilszulfát
TRIS	Trisz(hidroximetil)aminometán
TrisHCl	Trisz-hidroklorid
Taq	Thermus aquaticus DNS polimeráz
DNA	Dezoxiribonukleinsav
PI	Propidium-jodid
PBS	Phosphate buffered saline
RAPD-PCR	Random amplifikált plimorf DNS-polimeráz láncreakció
MM	Minimál médium
YPD	Yeast-dextróz-pepton médium
DTT	Ditiotreitol
CPE	Citromsav-foszfát-EDTA puffer
CPES	Citromsav-foszfát-EDTA-szorbitol puffer
LMP	Low melting point agar
ATCC	American Type Culture Collection
PEG	polietilénlikol

1. Bevezetés

1.1. Általános bevezetés

Az utóbbi években egyre növekszik a gombás eredetű fertőző betegségek száma. A jelenleg ismert mintegy 200 000 gombafajnak csak kis töredéke (~150) okoz illetve okozhat emberi megbetegedést. Ezen fajok közül az egyik legfontosabb a *Candida albicans*.

A szájpénész, mint klinikai jelenség már az ókor óta ismert. Hippokratesz „Járványok” című könyvében említést tesz két orális aftás esetről, amelyek valószínűleg a szájpénész betegséget takarják (Hippokratesz). Haussman szerint a *Candida* okozta vaginitis első leírása 1792-re tehető (Haussman 1980). Langenbeck 1839-ben említést tesz a gombáról egy tifuszos beteg esetében (Langenbeck 1839). Gruby 1842-ben (Gruby 1842) és Berg 1846-ban (Berg 1846) az első szerzők voltak, akik leírták, hogy a szájpénész gomba és a szájban található léziók között összefüggés van.

A *Candida albicans* opportunista patogén mikroorganizmus, amely kommenzalistaként megtalálható az egészséges ember szájüregében, emésztőtraktusában és 20,7 %-ban az egészséges nők hüvelyében is (Odds 1988). Egészséges emberben a gazdaszervezet és a gomba között fennálló egyensúly felborulhat és ez akár halálos kimenetelű szepszishez is vezethet. Az általa okozott kórképek sokfélesége miatt az egyik legveszélyesebb humán patogén gombának tekintik (Sherer és Magee 1990).

A *Candida albicans* által okozott megbetegedések két nagy csoportra oszthatók: felületi (szuperficiális) és mély (szisztémás) mikózisokra (Shepherd és munkatársai 1985, Odds 1988). A felületi mikózisokhoz tartoznak a bőr, a köröm, a szájüreg és a genitáliák gombás fertőzései. A candidózis szisztémás formáit Odds (1988) alapján két nagy csoportra oszthatjuk: a lokalizált, elsődleges megbetegedés, amely csak egyetlen szervet érint illetve a disszeminált candidózis (*Candida* sepsis), amelyben a *Candida* a véráram útján terjedve támadja meg a szerveket. A szisztémás mikózisok közé tartoznak a gasztrointesztinális traktus, a kiválasztórendszer, a légzőrendszer, a központi idegrendszer fertőzései (Odds 1988). Mint említettük, a *Candida albicans* kommenzalistaként jelen van az emberi szervezetben. A gomba a sejtjeinek felszínén számos olyan faktorral rendelkezik, amelyek lehetővé teszik ennek az állapotnak a fenntartását. Csökkent védekező képességű egyénben azonban ugyanezek a faktorok virulencia faktorokként szerepelnek. Ezek a faktorok különbözőek

lehetnek és a különböző *Candida* törzsekben eltérő mértékben fejeződik ki. Ez lehet az oka annak, hogy a kutatóknak mind a mai napig nem sikerült megtalálniuk „a” virulencia faktort. *Candida albicans*ban virulencia faktorként tartják számon a dimorfizmust (Mitchell 19978, Hostetter 1998, San-Blas 2000), az adhézión képességet (Cutler 1991, Calderone és munkatársai 2000, Sundstrom 1999), valamint extracelluláris enzimek termelését (Cutler 1991). Eddig számos olyan gént izoláltak (sejtfalgének, metabolikus gének, transzkripció faktorok), melyek elsődleges szerepük mellett a *Candida albicans* virulenciájában is szerepet játszottak (Navarro-Garcia 2001). A *Candida albicans* az antimikotikum terápiára, a szervezet immunválaszára és a szervezetben lezajló változásokra egy gyors alkalmazkodással válaszol, amelynek alapja a fent említett virulencia faktorok kifejeződése, a virulencia gének expressziója (Soll 2002), valamint a gomba különböző megjelenési formáinak (sarjadzó sejt, pszeudohifa, valódi hifa) antigénjeinek variabilitása (Poulain és munkatársai 1985). Az adhézió a kolonizáció előfeltétele és a fertőzés első lépcsőjét jelenti (Shepherd és munkatársai 1985, Cutler 1991). Számos szerző szerint a gomba tapadási képessége inert és biológiai felszínekhez korrelál a virulenciával (Ghannoum és Abu-Elteen 1986, McCourtie és Douglas 1984). A gomba tapadhat epiteliális sejtekhez, endoteliális sejtekhez szolubilis faktorokhoz, extracelluláris mátrixhoz valamint a gazdaszervezetben előforduló inert felületekhez (implantátumok). Számos mannoproteint azonosítottak, mint lehetséges adhezint (Chaffin és munkatársai 1998, Calderone és Braun 1991). A gazdaszervezet és a gomba közötti kölcsönhatás másik fontos tényezője, hogy a gomba hatására a szervezet immunválasszal reagál, amely a gomba sejtfal-összetevőinek hatására (glukán, kitin, mannoprotein) jön létre. Cutler és munkatársai felhívják a figyelmet arra, hogy az adhézión folyamatokban fontos szerepe van a gombasejt felszíni hidrofób jellegének is. A *Candida albicans* 37 °C-on tenyésztve hidrofil sejtnek viselkedik. Bizonyos körülmények között azonban (pl.: áttöltés friss tápoldatba vagy szövetkultúrába) a hidrofil sejtek 60 percen belül hidrofóbbá válnak (Hazen és munkatársai 1991). Megfigyelték, hogy egérgátásokban a hidrofób sejtek sokkal virulensebbek, mint a hidrofil sejtek és sokkal könnyebben kötődnek epitel sejtekhez. A hidrofób sejtek felszíne érzékeny a különböző proteázokra, ami azt sugallja, hogy a felszíni hidrofóbicitás fehérjének köszönhető (Hazen és munkatársai 1990).

A *Candida albicans* által létrehozott infekciókban fontos szerepe van a gazdaszervezet immunrendszerének illetve olyan tényezőknek, amelyek hajlamosíthatnak az infekcióra. Ezek változatosak lehetnek és Odds (1988) szerint a következőképpen csoportosíthatók (...táblázat).

... táblázat *Candida albicans* okozta infekcióra hajlamosító tényezők csoportosítása.

A hajlamosító tényezők osztályozása	Típusai	Néhány példa
Természetes tényezők	1. Fertőző, idiopátiás, veleszületett betegségek vagy rendellenességek	Mikrobiális fertőzések, endokrin működési zavarok, limfocita defektusok, fagocita abnormalitások
	2. Eltérések a normál fiziológiai állapottól	Terhesség, csecsemőkor, időskor
Táplálkozási tényezők	Egyes tápanyagok hiánya vagy túlsúlya megváltoztathatja a normál endogén mikrobiális flórát	Szénhidrát-gazdag táplálkozás, vitaminhiányok
Mechanikai tényezők	1. Sérülés 2. Szövetet érő hatások	Égések vagy egyéb sérülések Műfogsor viselése
Nozokomiális tényezők	1. Gyógyszeres kezelés, amely megváltoztatja az endogén mikrobiális flóra összetételét vagy rontja a szervezet védekezőképességét 2. Sebészeti beavatkozások, mechanikai eszközök vagy protézisek bevezetése a véredényekbe vagy szövetekbe	Antibiotikumok, kortikoszteroidok, egyéb immunszuppresszív gyógyszerek Bélcsatorna egy részének eltávolítása, intravaszkuláris katéterek, szívbillentyűk

Napjainkban legveszélyeztetettebb csoportjai a HIV fertőzöttek és a transzplantáltak, akiknél az immunszuppresszív állapot megkönnyíti a *Candida* infekció kifejlődését. A HIV pozitív betegek között több, mint 60 %-ban fordul elő orofaringeális *Candida* infekció (Johnson 2000). Csontvelő transzplantált betegeknél 12 %-ban fordul elő disszeminált candidiasis (Matthews és Burnie 1998). E két csoporton kívül veszélyeztetettek még a kórházban ápol,

csökkent immunrendszerrel rendelkező betegek, akik között a személyzet terjesztheti a *Candida* specieszeket. Egyes felmérések szerint ezen nozokomiális gomba infekciók az 1980-as évek 6 %-áról 10,4 %-ra emelkedtek, amelynek közel 80 %-át *Candida* specieszek adják (Verduyn Lunel 1999).

Az utóbbi években számos antifungális szert fejlesztettek ki. Mivel a gombák eukarióta élőlények, támadáspontjuk a gazdaszervezetben limitált. Támadáspont és vegyülettípus szerint a legismertebb antifungális szerek a táblázatban láthatók (Vanden Bossche és munkatársai 1994,).

táblázat Az antifungális szerek csoportosítása.

Támadáspont	Vegyület	Antifungális szer
DNS és RNS szintézis	Pirimidin	Flucitozin
Membrán permeabilitás	Poliének	Amfotericin B, Nystatin
Ergosterol szintézis		
Szkvalén epoxidáz	Allilaminok	Nafrifin, Terbinafin
14 α -demetiláz	Azolok	
	Imidazol	Bifonazol, Klotrimazol, Ekonazol, Ketokonazol, Mikonazol
	Triazolok	Flukonazol, Itrakonazol, Terkonazol, Vorikonazol
Δ^{14} -reduktáz	Morfolinok	Amozolfin
$\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ izomeráz	Morfolinok	Amorolfin
Mitózis		Griseofulvin
1,3- β -D-glukán szintézis	Echinocandinok	LY307853, L733560

1.2. A *Candida albicans* rendszertani besorolása

A *Candida albicans*nál mind a mai napig nem írtak le szexuális szaporodási ciklust, ezért a gombát az élesztőgombák közé sorolják. A Fungi imperfekti elnevezés is a szexuális szaporodási ciklus hiányára utal (Dixon és Fromtling 1995). Bár izoláltak olyan párosodás-

típus-szerű (MTL) lókuszokat és géneket, mint pl.: a CPH1, CAG1, DLH1, NDT80 és HST6 a *Candida albicans*ban (*Candida albicans* genom project: <http://alces.umn.edu/candida.html> és <http://www-sequence.stanford.edu/group/candida>), amelyek a *Saccharomyces cerevisiae* meiotikus differenciálódásában vesznek részt (Hull és Johnson 1999). A *Candida albicans* genomjának összehasonlító elemzése azt sugallja, hogy ez a gomba egy *Saccharomyces*-szerű meiotikus mechanizmussal rendelkezik, azonban az ebben szerepet játszó gének sérültek (Tzung és munkatársai 2001). A *Candida albicans* besorolását az alábbi táblázat tartalmazza (Barnett és munkatársai 2000).

1.2.1. táblázat A *Candida albicans* besorolása.

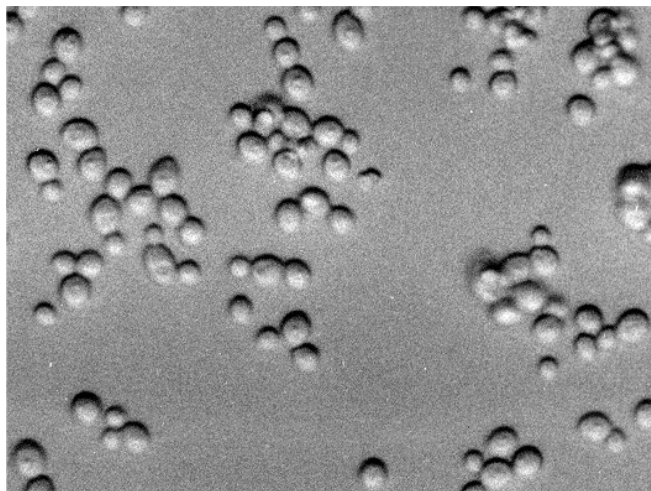
Élővilág	Fungi
Törzs	Ascomycota
Osztály	Hemiascomycetes
Rend	Saccharomycetales
Család	Candidaceae
Genusz	Candida
Faj	Candida albicans

A *Candida* genuszba több, mint 150 faj tartozik, de ezeknek csak kis számát tartjuk nyilván, mint orvosiilag jelentős fajt (Odds 1988). A legfontosabb patogének a *Candida albicans* után a *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* és a *C. tropicalis* (Haynes 2001). A *Candida* fajok közül egyedül a *Candida albicans* képes csíratömlő képzésére, a hifákon és a pszeudohifákon a terminális klamidospóra-képzésre, ezért részben ezen alapul az elkülönítésük (Odds 1988).

1.3. A *Candida albicans* megjelenési formái, dimorfizmus

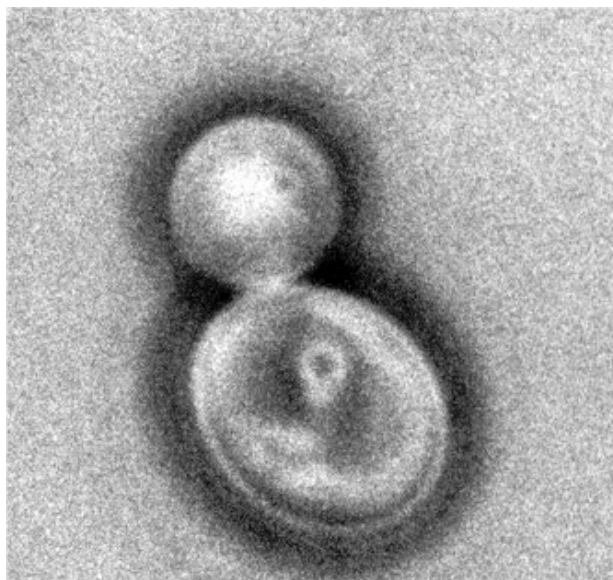
A dimorfizmus számos gomba sajátos jellemvonása: azt a képességet jelenti, hogy a gomba a környezeti feltételektől függően sarjadzó vagy fonalas formában forduljon elő (Kobayashi 1990). A *Candida albicans*, hasonlóan más humánpatogén gombákhoz, szintén mutatja a dimorfizmus jelenségét. Az átalakulásra jellemző, hogy a gomba a fertőzés kezdetén más morfológiát mutat, mint a fertőzött szövetben (Salfelder és munkatársai 1977, Watanabe

és munkatársai 1983). A *Candida albicans* leggyakoribb megjelenési formája a sarjadzó élesztő forma, amelyre jellemző, hogy a sejtek gömb illetve ellipszoid alakúak (ábra).



...ábra A *Candida albicans* sarjadzó sejtjei.

A sarjadzás során az élesztősejt organelumai egy kitüremkedésen keresztül jutnak át az utódsejtbe, amelyek a folyamat elején kisebbek, mint a szülői sejt (ábra).



...ábra A *Candida albicans* sarjadzása

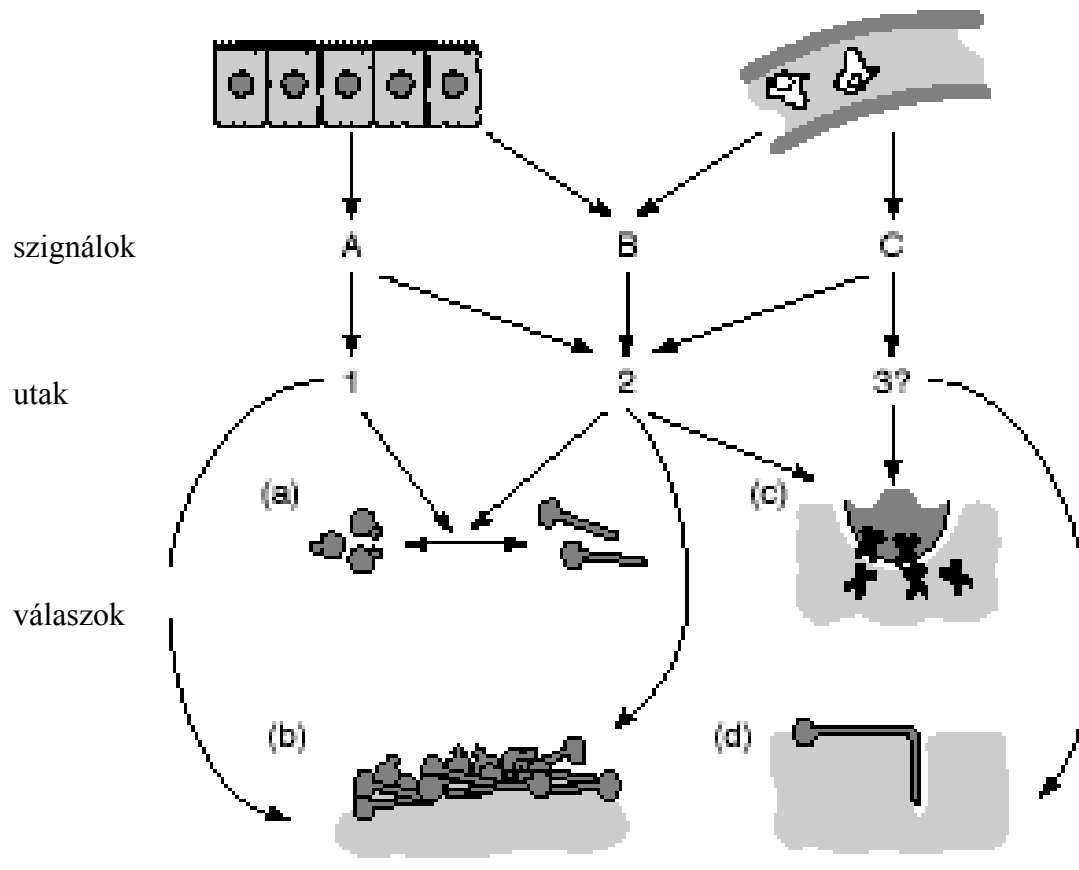
A hifás növekedési formában a sejtek megnyúlnak és tömlő formájúak (ábra). A hifában a sejtszakaszok szeptumokkal vannak elválasztva, melyeken 25 μm nagyságú pórusok

találhatók. Ezek megakadályozzák a sejtorganellumok vándorlását, de a citoplazma áramlását nem gátolják.



ábra. *Candida albicans* hifás növekedési formája.

A szövetek kolonizációja általában sarjadzó formában történik. Eddig úgy tartották, hogy a szövetekbe történő behatolás hifák segítségével megy végbe, azonban az újabb kutatások kimutatták, hogy a sarjadzó forma is képes a szövetekbe bejutni (Soll és munkatársai 1991). Ezen eredmények ellenére ma is csak hipotetikus modellünk van arra nézve, hogy a fertőzött szövetben levő mikrokörnyezet miképpen befolyásolja a fertőzés és a gomba terjedésének folyamatát. A .ábrán ez a modell látható (Brown és Gow 1999). Az utóbbi évek kutatási eredményei nagymértékben hozzájárultak a dimorfizmus molekuláris biológiai hátterének megértéséhez (Liu 2001).



...ábra A gazdaszervezetben levő mikrokörnyezet hatása a dimorfizmusra. Számos szignál specifikus az adott mikrokörnyezetre (A és C), míg mások általánosak (B). A szignál transzdukciós utak között átfedések vannak. A válaszok tartalmazzák a blasztospóra-hifa morfogenezist (a), a szövetekhez történő tapadást (b), hidrolitikus enzimek termelődését (c) és a tigmotropizmust. A hidrolitikus enzimek mind a blasztospórában, mind a fonalas formában termelődnek.

1.5. A switching jelensége a *Candida albicans*nál

A *Candida albicans* két szinten mutat fenotípusos variabilitást. Az egyik, hogy a sejtek reverzibilisen képesek élesztősejt-hifa átalakulásra. A másik változás a telepmorfológiában nyilvánul meg. Az eltérő telepmorfológiát egy genetikailag kódolt reverzibilis fenotípus váltás eredményezi. Ez a jelenség a switching, melynek magyar megfelelője nem ismeretes. Ez a fenotípus váltás spontán történik és gyakorisága nagyobb, mint a pontmutációé (Soll 1991,

Soll 1992). Talán a legdrámaibb switching rendszer az ún. „white-opaque” átalakulás, amelyet először egy immunszupprimált beteg véréből és tüdejéből izolált törzsnél írtak le (Slutsky és munkatársai 1987). A betegből izolált *Candida albicans* laboratóriumi körülmények között tenyésztve fehér színű telepeket képzett, azonban volt a telepek között néhány, amely szürke színű volt. A szürke színű telepeket tovább szélesztve a képződött telepek kis százalékban fehérek voltak. A fehér telepekben szürke színű szektort, míg a szürke telepekben fehér színű szektort lehetett megfigyelni.. Ha a mikromanipulátor segítségével egyetlen fehér színű „sejtből” vagy szürke színű „sejtből” képezték a telepeket, a switching megismétlődött (Soll 1991). Slutsky és munkatársai valamint Anderson és munkatársa azt tapasztalták, hogy a fehér színű telepek populációja nagyobb százalékban tartalmazott szürke színű telepformáló egységet, mint fordítva (Slutsky és munkatársai 1987, Anderson és Soll 1987). A szürke és fehér színű telepeket tartalmazó Petri csészéket 34 °C-on illetve 37 °C-on inkubálva, drámaian megnő a switching gyakorisága (Rikkerink és munkatársai 1988). Azonban a törzs nem csak sima felszínű telepeket tud képezni, hanem telepmorfológiai mutánsokat is: ún. „irregular-wrinkle” és „fuzzy” típusú telepeket (Soll 1991). A fehér és szürke színű telepeket alkotó sejtek fénymikroszkópos képét összehasonlítva a fehér sejtek blasztospóra-szerűek, míg a szürke sejtek megnyúlt blasztospóra-szerűek, amelyeknek a felszínén pásztázó elektronmikroszkópos képen jól látható szemölcsök találhatók. A fehér és a szürke sejtek sejtfehérjéinek összehasonlító kétdimenziós elektroforézise azt mutatja, hogy a fehér sejtek egy ún. W1 fehér-specifikus polipeptidet, ugyanakkor a szürke sejtek egy Op1 és Op2 szürke-specifikus polipeptidet tartalmaznak.

Napjainkban a legjobb modell a switching jelenségére egy genomikus átrendeződés vagy transzpozíció (Soll 1991, 1992). Ha a switching háttérben molekuláris mechanizmus áll, akkor ennek indokolnia kell: (1) a switching nagy gyakoriságát fehér → szürke irányban és a kisebb gyakoriságot ellenkező irányban; (2) az átalakult fenotípusok limitált számát; (3) az örökletességet; (4) a reverzibilitást; (5) a magas hőmérséklet okozta átalakulást egyik irányban; (6) az uv. stimulációt mindkét irányban és (7) a különböző génexpressziókat (Soll 1991, Soll 1992).

1.6. A *Candida albicans* virulencia faktorai

Bár a gombák okozta infekciók nem olyan fontosak, mint a baktériumok által okozottak, mégis előfordulásuk az utóbbi években lassan növekszik. Az USA-ban és máshol a világon a nozokomiális infekciók kiváltó okai között a *Candida* szpecieszek a negyedik helyet

foglalják el (Fidel és munkatársai 1999). A gomba sikeres kommenzalista. Ebben az esetben a gomba és a gazdaszervezet között egyensúly áll fenn, amely a gazdaszervezetben lejátszódó változások (pl.: immundeficiens állapot) hatására felborulhat. Ekkor azok a jellemző tulajdonságok, amelyek a kommenzalista állapot fenntartásában segítették a gombát, virulencia faktorokká lépnek elő (Cutler 1991). A virulencia faktor meghatározása egy kommenzalista mikroorganizmus esetében nehéz feladat. Elfogadott meghatározás, hogy virulencia faktor az a faktor, amely megnöveli a gomba virulenciáját a gazdaszervezetben (Hogan és munkatársai 1996).

Napjainkban nyolc faktort tartunk számon, mint a *Candida albicans* lehetséges virulencia faktorait (Cutler 1991, Odds 1994), melyeket a táblázat szemléltet.

.táblázat A *Candida albicans* lehetséges virulencia faktorai.

1.	A fenotípus gyors változása
2.	Hifa és/vagy pszeudohifa képzése
3.	Tigmotropizmus
4.	Felületi hidrofóbicitás
5.	Felületi virulencia molekulák
6.	Molekuláris mimikri
7.	Lítikus enzimek
8.	Növekedési arány és igénytelen tápanyag szükséglet

1.6.1. A fenotípus gyors változása

A *Candida albicans* meg tudja változtatni a fenotípusát, és ez a tulajdonsága lehetővé teszi, hogy a különböző gazda-mikrokörnyezetekhez alkalmazkodjon. A mikroorganizmusok különböző környezetekben általában különböző fenotípusokat fejeznek ki, addig a *Candida albicans* rendelkezik egy olyan tulajdonsággal, hogy újrendezze és szabályozza a genetikai tulajdonságait. Ez a képessége megkönnyíti, hogy a fenotípusok közül azt fejezze ki, amelyik az adott mikrokörnyezetben számára a legmegfelelőbb. A *Candida albicans*ra jellemző néhány olyan virulencia tulajdonság, amelyek különbözőképpen expresszálódnak a sejtben, annak részeiben vagy a mikrokörnyezetben. Ez a különleges tulajdonsága lehetővé teszi a

virulencia faktorok és a kolonizáció sokféle fajtává válását valamint terjedésüket egyik mikrokörnyezetből a másikba, elősegítve ezzel a fertőzés folyamatát (Odds 1994).

1.6.2. Hifa és/vagy pszeudohifa képzése

Az élesztő sejtforma és a hifa/pszeudohifa virulenciájának összehasonlítása rendkívül nehéz, mert nem rendelkezünk olyan metodikával, melynek segítségével összehasonlításra alkalmas sejtpreparátumot készíthetnénk (Cutler 1991). Míg az élesztő sejtalakból homogén szuszpenzió készíthető és annak sejtszáma fénymikroszkóppal számolható, addig a hifák összeragadva csomókat képeznek egy nem homogén szuszpenzióban, ezzel lehetetlenné téve a direkt mikroszkópos sejtszámolást.

Hisztopatológiai megfigyelések azt mutatják, hogy fertőzött szövetben mind az élesztősejt, mind a fonalas forma megtalálható. Számos kísérlet bizonyítja, hogy a *Candida albicans* blasztospóra és fonalas forma virulenciája között különbségek vannak (Shepher 1985, Ryley és Ryley 1990, Hazen és munkatársai 1991). Ezen felül a hifás forma sokkal könnyebben kötődik a gazdasejt felszíneihez, mint az élesztősejtes forma. Valószínű, hogy a hifás növekedésben szerepet játszó Efg1p és Cph1p transzkripciós faktorok szabályozhatják adhezív molekulák bioszintézisét (San-Blas és munkatársai 2000). Miután a fonalas forma kötődött a gazdaszervezet kolonizálandó helyére, ezt a helyet mintegy szubsztrátként biztosítja az élesztősejtes forma részére. Úgy tűnik, hogy a szöveti kolonizációban sokkal kisebb szerepe van a blasztospóra-hifa átalakulásnak, mint a hifa-blasztospóra átalakulásnak (Odds 1994).

1.6.3. Tigmotropizmus

A *Candida albicans* hifái a felületről az agar belseje felé a pórusokon és járatokon keresztül illetve ezek mentén nőnek. A gombának ez a tulajdonsága elősegítheti a *Candida albicans* hifáinak terjedését a szövetben a mikroszkópikus méretű törések és mikrocsatornák mentén (San-Blas és munkatársai 2000).

Néhány kísérleti *Candida albicans* infekcióban a hisztopatológiai kép azt mutatta, hogy ha a gomba a bőr és vagina keratinizált sejtjeit támadta meg, a hifák terjedése a keratinizált sejtek

mentén vagy azokon keresztül történt és ez megegyezett a tigmotropikus válasszal (Odds 1994, Sherwood 1992).

1.6.4. Felületi hidrofóbicitás

A *Candida albicans* sejtek felületi hidrofób jellegének mértéke nem csak a felszínhez történő kötődéshez járul hozzá, hanem a csíratömlőképzés sebességéhez is. Ez a viselkedés jól jellemzi a lehetséges virulencia faktorok egymásra utaltságát (Odds 1994).

A 25 °C-on tenyésztett hidrofób *Candida albicans* sejtek virulensebbek, mint azok a hidrofil sejtek, melyeket 37 °C-on tenyésztettek (Hazen és munkatársai 1991).

1.6.5. Felületi virulencia molekulák

A gazdaszervezet és a gomba közötti felületen fontos virulencia molekulák találhatók. Például adhezinek, melyek segítik a *Candida albicans* megtapadását az epiteliális sejtek felszínén. A *Candida albicans* fontosabb felszíni kötőhelyei: C3d, iC3b, fibrinogén, laminin, fibronektin (Calderone és Braun 1991). Ezek közül egyesek vagy csak az élesztősejten vagy csak a hifán/pszeudohifán expresszálódhatnak. Az iC3b-t eddig még nem figyeltek meg élesztősejtes formán. Az iC3b kötőmolekulája hőlabilis és kifejeződése a *Candida albicans* pszeudohifán hőmérsékletfüggő. (Calderone és Braun 1991).

Az anti-fibrinogén ellenanyag segítségével elvégzett immunfluoreszcens vizsgálatok igazolták, hogy a fibrinogén a csíratömlő és a hifa sejt falán kifejeződik, míg a nem sarjadzó élesztősejtes forma falán nem (Bonali és munkatársai 1986, 1987).

A *Candida albicans* felszíni adhezinjei három csoportba sorolhatók: (1) a glikoprotein fehérje része a célsejt Arg-Gly-Asp szekvenciájú glikoproteinjeihez kötődik (pl.: fibronektin, vitronektin, kollegén, laminin); (2) a glikoprotein fehérje része a célsejt membrán glikoproteinjének cukorrészéhez kötődik; (3) a mannoprotein poliszacharid része ismeretlen célsejt receptorhoz kötődik (Odds 1994).

1.6.6. Molekuláris mimikri

Ebben az esetben a mikroorganizmus képes termelni olyan felszíni molekulákat, amelyek utánozzák a célsejt saját molekuláit, ezáltal a mikroorganizmus kevésbé felismerhetővé válik az immunrendszer számára. A *Candida albicans* sejteket, amelyek a véráramban cirkulálnak

gyorsan befedi a gazdaszervezet vérlemezkéi a fibrinogén-kötő ligandok segítségével. A vérlemezkék kötődése a szervezet válasza a gomba megjelenésére, azonban pont a vérlemezkék miatt a gomba „láthatatlanná” válik az immunrendszer számára (Robert és munkatársai 1991).

1.6.7. Lítikus enzimek

A *Candida albicans* által kiválasztott vagy a felszínen expresszált enzimek közül a legfontosabbak a proteinázok, a foszfolipázok, a lipázok, foszfomonoészterázok. Ezek közül a legjobban jellemzett a szekretált aszpartil proteáz (Navarro-Garcia és munkatársai 2001). Proteinázokat csak a legvirulensebb *Candida albicans* törzsek termelnek. A *Candida albicans* szekretált aszpartil proteázai különböző környezeti körülmények között különbözőképpen expresszálódnak. Míg a SAP2 savas pH tartományban, addig a SAP4-6 semleges pH-n fejeződik ki (Navarro-Garcia és munkatársai 2001).

Egy másik lítikus enzimről, a foszfolipázról leírták, hogy génjének delécioja nem okozott változásokat az adhéziós jellegben, azonban csökkent terjedési képességet váltott ki (Leidich és munkatársai 1998).

1.6.8. Növekedési arány és igénytelen tápanyagszükséglet

A lassan növvő mikroorganizmusokat a gazdaszervezet felismeri és eliminálja, ellentétben a gyorsan növekvő és szaporodó törzsekkel.

A különleges tápanyagigény szintén negatív virulencia faktorként szerepelhet, ugyanis limitálhatja a *Candida albicans* szaporodási sebességét. A *Candida albicans* tápanyagigény szempontjából az igénytelen mikroorganizmusok közé tartozik, virulenciája azonban csökken az auxotróf mutánsok (Pl.: adenin, lizin szerin uracil) esetében, a légzési mutánsoknál és a pirimidin transzport mutánsoknál (Odds 1994).

2. Célkitűzés

Mint ismeretes, a *Candida albicans* a külső környezeti tényezők megváltozására dimorfizmussal és morfogenezissel válaszol. Ezek a környezeti hatások nem csak a szervezeten kívül vannak hatással a mikroorganizmusra, hanem a gazdaszervezeten belül is. A szervezeten belül jelentkező hatások, mint pl.: pH, szérum, aminosavak, előidézhetik a morfogenezist (Odds 1985), amely megnehezítheti a gomba elleni sikeres védekezést mind a gazdaszervezet, mind a terápia szempontjából. Ugyanis a blasztospóra és a pseudohifa, valamint a hifa felszínén különböző antigén-determinánsok expresszáldhatnak, amelyek befolyásolhatják a virulenciát (Poulain és munkatársai 1985).

Kísérleteinkben modellezni kívántuk a szervezetben lejátszódó morfogenezist, amely nem csak a sejtípus, hanem a telepmorfológia megváltozásával is együtt jár. Ennek érdekében indukált mutagenézissel telepmorfológiai mutánsokat állítottunk elő. Ez lehetőséget teremtett a morfogenezis során bekövetkező morfológiai, genetikai és patogenitási változások tanulmányozására.

Célkitűzéseink a következők voltak:

1. Az indukált mutagenézissel (NTG, UV) létrejött *Candida albicans* mutánsok telepmorfológiája és a telepeket alkotó sejtípus közötti összefüggés vizsgálata.
2. Telepmorfológiai szinten jelentkező változások domináns vagy recesszív öröklődésének vizsgálata protoplasztfúzió segítségével.
3. Protoplasztfúzió után változik-e a sejtek mérete, alakja.
4. A létrejött mutánsokban illetve létrehozott hibridekben milyen genetikai változások jelentkeznek a génexpresszió szintjén az izoenzim mintázatban.
5. A külső hatásokra (mutagenézis) létrejött telepmorfológiai változás illetve a protoplasztfúzió előidéző-e, és ha igen milyen mértékű kromoszómális újraszerveződést a kariotípus szintjén.
6. A morfogenezis és a protoplasztfúzió hatása a RAPD-PCR mintázat szintjén jelentkező genetikai variabilitásra.
7. A telepmorfológia és az ezzel összefüggő egyes sejtípusok hatása a gomba patogenitására illetve virulenciájára.

8. A mutagenézis és a szomatikus hibridizáció hatása a fehérjeszinten megnyilvánuló genetikai változásokra az SDS-PAGE mintázatban.

3. Anyagok és módszerek

3.1. *Candida albicans* törzsek

A kísérletben használt törzseket a 3.1.1. táblázat, a törzsfát a 3.1.1. ábra szemlélteti.

3.1.1. táblázat A kísérletek során felhasznált *Candida albicans* törzsek.

Kód	Eredeti kód	Genotípus	Eredet	Referencia
S1	ATCC 10261	prototróf	ATCC	Payton és DeTiani, 1990
S2	169	lys ⁻ leu ⁻	S1	Hubbard és munkatársai, 1986
S3	170	lys ⁻ met ⁻	S1	Novák és munkatársai, 2002 (kézirat)
S4	172	lys ⁻ ade ⁻	S1	Novák és munkatársai, 2002 (kézirat)
M1	hoG301	prototróf	S1	Novák és munkatársai, 2002 (kézirat)
M2	167ade ⁻	ade ⁻	M1	Novák és munkatársai, 2002 (kézirat)
M3	169/3	lys ⁻ leu ⁻	S2	Novák és munkatársai, 2002 (kézirat)
M4	170/2/2	lys ⁻ met ⁻	S3	Novák és munkatársai, 2002 (kézirat)
M5	172/2	lys ⁻ ade ⁻	S4	Novák és munkatársai, 2002 (kézirat)
H1M	X/1	prototróf	M2 és M4 közötti fúzió	Novák és munkatársai, 2002 (kézirat)
H9S	X/9	prototróf	M2 és M4 közötti fúzió	Novák és munkatársai, 2002 (kézirat)

Kísérleteinkben *Candida albicans* vad típusú (ATCC 10261) törzsét használtuk, melyből indukált mutagenézissel (ultraibolya sugárzás, nitrozoguanidin) kétszeres auxotróf és telepmorfológiai mutánsokat állítottunk elő. A fonalas formát képző telepmorfológiai mutánst Russel Poulter bocsátotta rendelkezésünkre. A hibrideket a mutánsok közötti Ca^{2+} -PEG indukálta szomatikus hibridizációval hoztuk létre. A fúziók során használt törzseket és azok jellemzőit a . táblázat tartalmazza.

....táblázat A fúziók során felhasznált törzsek jellemzői

Kód	Genotípus	Eredet	Telepmorfológia	Sejttípus
S2	lys ⁻ leu ⁻	S1	sima	blasztospóra
S3	lys ⁻ met ⁻	S1	sima	blasztospóra
S4	lys ⁻ ade ⁻	S1	sima	blasztospóra
M2	ade ⁻	M1	rögös	valódi hifa
M3	lys ⁻ leu ⁻	S2	rögös	90 % blasztospóra 10 % pszeudohifa
M4	lys ⁻ met ⁻	S3	rögös	90 % blasztospóra 10 % pszeudohifa
M5	lys ⁻ ade ⁻	S4	rögös	90 % blasztospóra 10 % pszeudohifa

3.1.1. Törzsek fenntartása

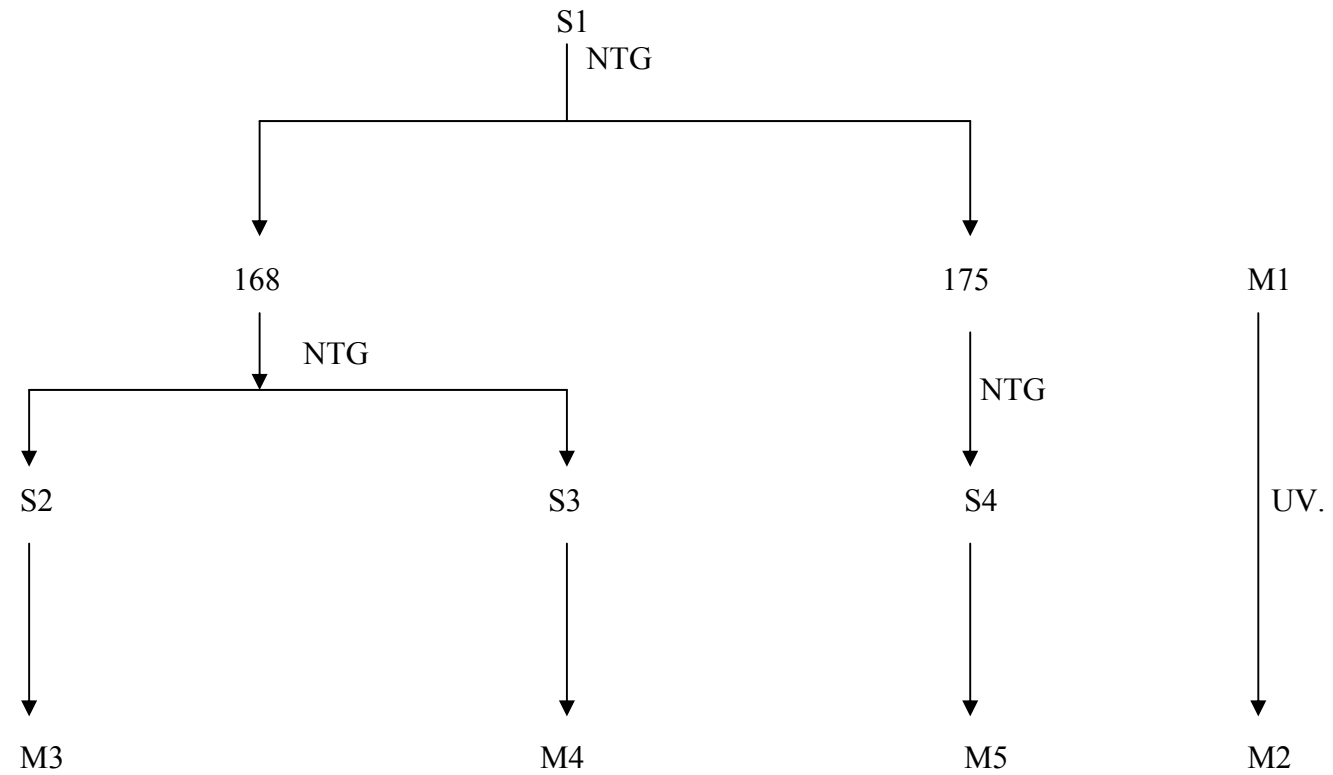
A kísérletben használt törzseket (hibridek kivételével) YPD a hibrideket MM ferde táptalajon +4 °C-on tartottuk fent. A törzsek áttöltése kéthavonként történt. Ezzel párhuzamosan a törzseket 20 % glicerint tartalmazó YPD tápoldatban –80 °C-on tároltuk.

3.2. A RAPD-PCR vizsgálathoz használt primerek a 3.2.1. táblázatban láthatók.

3.2.1. táblázat

A PCR során használt primerek.

Név	Hosszúság (bp)	Szekvencia (5'—3')
OPC 02	10	GTGAGGCGTC
OPC 05	10	GATGACCGCC
OPC 14	10	TGCGTGCTTG
OPC 18	10	TGAGTGGGTG
OPC 19	10	GTTGCCAGCC
OPC 20	10	ACTTCGCCAC
OPQ 06	10	GAGCGCCTTG
R 108	10	GTATTGCCCT



.ábra A kísérletben használt *Candida albicans* törzsek törzsfája.

3.3 Vegyszerek

3.3.1. Vegyszerek, reagensek

Az élesztőkivonat és az agar az OXOID (Basingstoke, Hampshire, Anglia) terméke volt. A peptont a Difcotól (Detroit, Michigan, USA) vásároltuk. A glükóz és az aminosavak a Reanaltól (Budapest, Magyarország) származtak. A para-fluorofenilalanin, Trichoderma Lysing Enzyme (kód: L1412) és a Low Melting Point Agar a Sigma-Aldrich Kft. (Budapest, Magyarország), az agaróz a Merck Kft. (Budapest, Magyarország) terméke volt. A RAPD-PCR-hez használt enzim, $MgCl_2$, puffer és primerek a Biocenter Kft.-től (Szeged, Magyarország) származtak. Minden más, általunk használt vegyszer analitikai tisztaságú volt és a Reanal cégtől (Budapest, Magyarország) vásároltuk.

3.3.2. Pufferek

A kísérletben használt pufferek Sambrook és munkatársai (1989), Brown (1991) valamint Varga és Vágvolgyi (1994) útmutatásai alapján készültek.

3.3.3. Táptalajok

A felhasznált táptalajok összetétele (Rutschenko-Bulgac 1991) a függelékben található.

3.4. Protoplasztképzés és fúzió

3.4.1. Protoplasztképzés

Közép-log fázisú sejteket 4000 rpm-en , 5 percig centrifugáltunk, majd 15 percig, 30 °C-on előkezelő oldatban inkubáltuk, hogy a sejtfalat lazítsuk a könnyebb emészthetőség miatt. Inkubálás után a sejteket kétszer mostuk 0,6 M KCl oldatban és 5 mg/ml Trichoderma Lysing Enzyme oldat segítségével emésztettük 45 percig, 30 °C-on inkubálva. A keletkezett protoplasztokat 2000 rpm-en, 5 perc centrifugálással összegyűjtöttük. A szuszpenziót kétszer mostuk 0,6 M KCl oldattal , majd a protoplasztokat 0,3 M CaCl oldatban felvettük. (Ferenczy és Maráz 1977, Pesti és Ferenczy 1982).

3.4.2. Protoplasztfúzió

A fúziós partnerek protoplaszt-számát 10^8 /ml-re beállítottuk, és mindkét szuszpenzióból 1-1 ml-t összekevertünk és a protoplasztokat centrifugálással összegyűjtöttük. A kiülepített protoplasztokat Ca^{2+} -PEG 6000 oldatban felvettük és a keveréket 15 percig inkubáltuk 30 °C-on. (Ferenczy és Maráz 1977, Pesti és Ferenczy 1982).

3.4.3. Protoplaszt regeneráció

Az inkubálási idő letelte után a szuszpenzió 100-100 µl-ét 10-1 ml 45 °C-os fedőagarba (OSA) kevertük és ozmotikusan stabilizált minimál táptalajra (OSM) öntöttük. Protoplasztképzési és regenerációs gyakoriság számolásához a szülői törzseket desztillált vízben és 0,3 M CaCl oldatban 10^3 /ml sejtszámig hígítottuk, majd 100 µl szuszpenziót 10 ml fedőagarba kevertünk és ozmotikusan stabilizált komplett (OSK) valamint a szülői auxotrófiának megfelelő aminosavval kiegészített OSM táptalajra öntöttük. (Ferenczy és Maráz 1977, Pesti és Ferenczy 1982).

3.5. Pásztázó elektron mikroszkópos felvételek

A képek Fujita és munkatársai (1971) és Barnes és munkatársai (1971) továbbfejlesztett metodikái alapján készültek.

A törzsekből folyékony komplett (YPD) táptalajban 30 °C-on egy éjszakán át rázatott tenyészetet készítettünk. Másnap a szuszpenzió 15 ml-ét 4 °C-on, 4000 rpm-en, 15 percig centrifugáltuk. A csapadékot kétszer mostuk 0,1 M Na-foszfát pufferben. Mosás után a csapadékot 5 ml 2,5 % glutáraldehid oldatban felfuszpendáltuk és 1 órán át szobahőmérsékleten fixáltuk. Fixálás után a sejteket centrifugáltuk és kétszer mostuk 0,1 M Na-foszfát pufferben. Mosás után a sejteket 5 ml 2 % ozmium tetraoxid oldatban felvettük és a sejteket utófixáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. Ezután a sejteket újból mostuk 0,1 M Na-foszfát pufferben, majd kétszer desztillált vízben. A csapadékot 5 ml növekvő koncentrációjú etanolban (30, 50, 70, 80, 90, 95 és 100 %) dehidráltuk 5-5 percig. Az utolsó dehidrálnál lépésnél az alkoholos szuszpenzióból 1 cseppet tárgylemezre cseppentettünk és szobahőmérsékleten beszárítottuk. Arannyal bevontuk (IFC-1100 Ion-Sputter JEOL, 1100 V, 5 mA, 50 perc) és JEOL JSM6300 Scanning Electron Microscope-pal vizsgáltuk.

3.6. DNS mennyiségi meghatározás flow citométerrel

A DNS mennyiségi meghatározása propidium-jodid festék segítségével történt (Stöver és munkatársai 1998). A törzsek auxotrófiájának megfelelő aminosavval kiegészített minimál tápoldatban 30 °C-on, 250 rpm rázatással egy éjszakás tenyészetet készítettünk. A tenyészetet lecentrifugáltuk, kétszer mostuk desztillált vízben és Bürker kamrában meghatároztuk a sejtszámot. 10^7 /ml sejtet 3000 rpm-en, 5 percig centrifugáltunk. A csapadékot 3 ml desztillált vízben felvettük és 7 ml etanolt adtunk hozzá. A csöveket 4 °C-on egy éjszakán keresztül inkubáltuk. Másnap a sejteket lecentrifugáltuk (3000 rpm, 5 perc) és a csapadékot 5 ml 50 mM Na-citrát oldatban (pH 7,0) felvettük. Újabb centrifugálás (3000 rpm, 5 perc) után a sejteket 1 ml 50 mM Na-citrát oldatban felfuszpendáltuk és az 5 mg/ml RN-áz törzsoldatból 50 µl-t adtunk hozzá. A szuszpenziót 37 °C-os vízfürdőben 1 órán át inkubáltuk, hogy eltávolítsuk az RNS-t. Inkubálás után a 2,5 µg/ml propidium-jodid törzsoldatból 1 ml-t adtunk az RN-áz kezelt sejtekhez és a mintákat flow citométerrel (FACSScalibur, Becton-Dickinson) vizsgáltuk.

3.7. Izoenzim vizsgálat

3.7.1. Feltárás

50 ml YPD tápoldatban 30 °C-on inkubált 24-48 óráig rázatott tenyészetet készítettünk. A teljes szuszpenziót 4 °C-on, 4000 rpm-en, 15 percig centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük és a csapadékot -20°C-on megfagyasztottuk. A fagyott gomba 2 grammját folyékony nitrogénben összetörtük, hogy feltárjuk a sejteket. A porrá dörzsölt gombára 2 ml extrakciós puffert mértünk és jégen inkubáltuk 45 percig. A kezelés után a szuszpenziót 4°C-on, 15000 rpm-en, 30 percig centrifugáltuk. A felülúszóhoz másfélszeres mennyiségű brómfenolkék oldatot adtunk és a szuszpenziót -20 °C-ra helyeztük (Davis 1964, Kálmán és munkatársai 1991).

3.7.2. Gélfuttatás

A futtatáshoz 7,5 %-os futtató gélt és 4 %-os gyűjtőgélt öntöttünk. A gélt (20x20 cm) 220 V-on előfuttattuk, majd a zsebekbe a vizsgálandó enzimtől függően 10-100 µl mintát mértünk és a gélt egy éjszakán keresztül 120 V-on futtattuk.

3.7.3. A gél előhívása

Futtatás után a gélt az enzimnek megfelelő előhívó oldatba helyeztük az enzimeknek megfelelő sávok megjelenéséig. Előhívás után a reakciót 8 %-os ecetsav oldattal állítottuk le, kivéve a kataláz enzim esetében.

3.7.3.1. Glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz enzim előhívása

A festékoldatot összemérjük és a gélt az oldatba helyeztük. A sávok megjelenése után a gélt 8 %-os ecetsav oldatba helyeztük, majd desztillált vízben tároltuk (Mulvey és Vrijenhoek 1981).

3.7.3.2. Glutamát dehidrogenáz enzim előhívása

Az előző pontban leírtaknak megfelelően történik (Anne és Peberdy 1981).

3.7.3.3. Malát dehidrogenáz enzim előhívása

A 3.7.3.1. pontban leírtaknak megfelelően (Brewer 1970).

3.7.3.4. Kataláz enzim előhívása

A gél 10 percig desztillált vízben mostuk, majd 0,003 %-os H_2O_2 oldatban inkubáltuk 10 percig. A gél desztillált vízben előblítettük és 2 % FeCl_3 és 2 % $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1:1 arányú oldatába helyeztük 10 percre. Az inkubációs idő letelte után a gél desztillált vízben előblítettük és sötétben tároltuk (Woodburg és munkatársai 1971).

3.8. Tapadás akrilátfelszínhez

A törzseket YPD tápoldatban 30 °C-on, 18 órán át 250 rpm-en rázatva tenyésztettük. A szuszpenzió 15 ml-ét lecentrifugáltuk (4 °C, 4000 rpm, 10 perc) és kétszer mostuk PBS-sel. Az akrilát lapokat (0,5x0,5x0,1 cm) 2,5 ml 5×10^7 /ml koncentrációjú sejtsuszpenzióban 30 °C-on, 1 órán át „fej-láb” ráztattuk. Az inkubálás után a lapokat steril PBS-sel lemostuk, hogy eltávolítsuk a nem tapadt *Candida albicans* sejteket, majd az akrilát lapokat 5-5 ml YPD tápoldatba helyeztük és 16 illetve 20 órán keresztül 30 °C-on inkubáltuk. A gombasejtek mennyiségét $\lambda=640$ nm-en történő fotometrálassal határoztuk meg. Az adhéziónak a képesség összehasonlíthatóságának érdekében az optikai denzitást az akrilát lapok felületére (cm^2) vonatkoztattuk. (Ellepola és Samanarayake 1998).

3.3. Patogenitásvizsgálat egérben

A kísérletben 10-12 gramm tömegű nőstény CFLP (Carworth Farm Lane Petter) specifikus patogén mentes egereket használtunk, amelyeket a ketrecekben ötös csoportokban helyeztünk el.

A gombatorzsek 30 °C-on, egy éjszakán át YPD tápoldatban 25 rpm-en rázatott tenyészetét centrifugálás (4000 rpm, 5 perc) után PBS-sel kétszer mostuk, majd a Bürker kamrás sejtszámolás után a sejtszámot 10^8 /ml-re állítottuk be. A törzsszuszpenzióból 1:5, 1:25 és 1:125 hígításokat készítettünk PBS-ben. A szuszpenziókból 500-500 µl-t oltottunk az egerek farokvénájába. Törzsenként illetve hígításonként 5-5 egeret oltottunk. Az egerek túlélését 21 napon át követtük napi egyszeri ellenőrzéssel (Shepherd 1985).

3.10. RAPD-PCR vizsgálat

3.10.1. DNS kivonás

A gombát 30 °C-on rázatva 24-48 órán keresztül növesztettük YPD tápoldatban. A teljes tenyészetet 4 °C-on, 4000 rpm-en, 15 percig centrifugáltuk és a csapadékot -20 °C-on megfagyasztottuk. A fagyott gomba 2 grammját folyékony nitrogénben porrá törtük, majd 4 ml jéghideg LETS puffert és ugyanennyi fenolt mértünk rá. Vortexelés után a szuszpenziót 15000 rpm-en, 4 °C-on, 30 percig centrifugáltuk. A felülúszóhoz azzal azonos mennyiségű fenolt adtunk, majd alapos összekeverés után a szuszpenziót lecentrifugáltuk (4 °C, 15000 rpm, 30 perc). A felülúszóhoz azzal azonos térfogatú fenol:kloroform 1:1 arányú keverékét adtuk és vortexelés után a szuszpenziót centrifugáltuk (4 °C, 15000 rpm, 30 perc). A felülúszóhoz azzal azonos mennyiségű kloroform:izoamilalkohol 24:1 arányú keverékét adtuk, majd újból centrifugáltuk (4 °C, 15000 rpm, 30 perc). A felső fázishoz kétszeres mennyiségű etanolt adtunk, hogy kicsapjuk a DNS-t és a szuszpenziót -20 °C-ra helyeztük. Centrifugálás után (4 °C, 14000 rpm, 20 perc) a képződött csapadékot vákumban megszárítottuk és 100 µl TE pufferben felvettük (Williams és munkatársai 1990, Papp és munkatársai 1997).

3.10.2. A RAPD-PCR körülményei

A reakció 25 µl végtérfogatban történt, melynek összetétele a következő volt:

10 X PCR puffer	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	2,5 µl
100 mM dATP	1,0 µl
100 mM dCTP	1,0 µl
100 mM dGTP	1,0 µl
100 mM dTTP	1,0 µl
5 U/µl Taq polimeráz	0,2 µl
200 µM primer	1,0 µl
desztillált víz	12,8 µl
50 ng/µl genomikus DNS	2,0 µl
	<hr/>
	25 µl

A mintákat 40 µl steril ásványi olajjal fedtük. A kontroll minta a genomikus DNS kivételével az összes többi alkotóelemet tartalmazta.

A reakció lépései:	93 °C	1 perc	
	92 °C	1 perc	} 45 ciklus
	37 °C	1 perc	
	72 °C	2 perc	
	72 °C	5 perc	

Az amplifikált minta 10 µl-ét 1 %-os agaróz/TAE gélen választottuk szét. Markerként HindIII és EcoRI restrikciós endonukleázokkal emésztett λ DNS-t használtunk (Williams és munkatársai 1990, Papp és munkatársai 1997).

3.11. SDS-PAGE vizsgálat

A 30 °C-on, 250 rpm-en YPD tápoldatban rázatott tenyészetet lecentrifugáltuk (4 °C, 3500 rpm, 10 perc). A csapadékot kétszer mostuk 1 M szorbitol oldatban, majd 10 ml előkezelő oldatban vettük fel, hogy fellazítsuk a sejtfal szerkezetét. A szuszpenziót 30 °C-on 15 percig inkubáltuk és kétszer mostuk 1 M szorbitol oldatban. A csapadékot 5 mg/ml koncentrációjú 20 ml végtérfogatú Trichoderma Lysing Enzyme oldatban felvettük és gyenge rázás mellett (100 rpm) 30 °C-on 45 percig inkubáltuk. A protoplaszt képződését nyomon követtük a szuszpenzió desztillált vízben és 1 M szorbitolban történt hígításával. A protoplasztképződés lejárásodása után az enzimet kicentrifugáltuk (2000 rpm, 2 perc) a szuszpenzióból és a csapadékot 1 M szorbitolban felvéve Bürker kamrás számolás után a sejtszámot 10^8 /ml-re állítottuk be. A szuszpenzió 4 ml-ét lecentrifugáltuk és 200 µl mintapuffert mértünk hozzá. A mintákat 10 percig főztük forrásban levő vízben és 8 µl mennyiséget vittünk fel a 12,5 %-os géltre. A gélt 1 órán keresztül futtattuk 120 V-on. Futtatás után a gélt egy éjszakán át gyors kimosó oldatban tartottuk, utána 3 órán keresztül festettük, majd kimosó és tároló oldatban differenciáltuk (Laemmli 1970, Casanova és munkatársai 1989, Al-Rawi és Kavanagh 1998).

3.13. Szegregáció

3.13.1. Spontán szegregáció

A hibrideket folyékony YPD tápoldatban 30 °C-on 250 rpm rázatással egy éjszakán át tenyésztettük. Másnap a sejteket centrifugáltuk (3500 rpm, 5 perc) és kétszer mostuk PBS-sel. Bürker kamrás számolás után a szuszpenzió sejtszámát 10^3 /ml-re állítottuk be. YPD lemeztáptalajra 50 µl szuszpenziót szélesztettünk és 4 napig inkubáltuk 30 °C-on. A telepeket Lederberg módszer segítségével replikáztuk komplett, minimál és a szülői törzsek auxotrófiájának megfelelő aminosavval kiegészített minimál táptalajra. A petri csészéket 6 napig inkubáltuk 30 °C-on.

3.13.2. Indukált szegregáció

3.13.2.1. Para-fluorofenilalanin MIC értékének meghatározása

Az YPD tápoldatban 30 °C-on rázatott tenyészetet centrifugálás után kétszer mostuk PBS oldatban. A sejtszámot 10^7 /ml-re állítottuk be. A szuszpenzióból 10 µl-t foltoltásként a különböző koncentrációjú p-fluorofenilalanint tartalmazó YPD lemeztáptalajokra oltottunk. A csészéket 7 napig inkubáltuk 30 °C-on.

3.13.2.2. Indukált szegregáció

A törzseket a megállapított MIC értékű p-fluorofenilalanint tartalmazó YPD táptalajon növesztettük, majd a törzsekből 30 °C-on, YPD tápoldatban rázatott kultúrát készítettünk. A sejteket másnap kétszer mostuk PBS-ben és a sejtszámot 10^3 /ml-re állítottuk be. A szuszpenzió 50 µl-ét YPD lemeztáptalajra szélesztettük és a csészéket 4 napig, 30 °C-on inkubáltuk. A kinőtt telepeket komplett, minimál és a szülői törzsek auxotrófiájának megfelelő aminosavval kiegészített minimál táptalajra replikáztuk. A csészéket 7 napig inkubáltuk 30 °C-on.

3.14. Kariotipizálás

A törzseket 48 órán át YPD lemeztáptalajon inkubáltuk 30 °C-on. 1 ml desztillált vízben felszuszpendáltunk egy kacsnyi tenyészetet és 4 °C-on, 4000 rpm-en, 5 percig centrifugáltuk. A felülúszót elöntöttük és a csapadékot kétszer mostuk 50 mM EDTA-ban (pH 7,5). Centrifugálás (4 °C, 4000 rpm, 5 perc) után a felülúszót ismét elöntöttük és a sejteket 75 µl CPES pufferben (1 ml CPES + 1 ml 1 M EDTA pH 7,5 + DTT, hogy a végkoncentráció 5 mM legyen). A szuszpenziót alapos összekevertük. Közben elkészítettük az LMP agarózt, amelyet desztillált vízben oldottunk és felmelegítettünk (3,1 mg LMP 0,22 ml desztillált vízben oldva 1 mintához), majd 0,88 mg/1 minta Lysing Enzyme-ot oldottunk benne és az előkészített mintával együtt 42 °C-os vízfürdőbe helyeztük. A mintákhoz 165 µl enzimet tartalmazó agarózt adtunk és ebből 100-100 µl-t két blokkba pipettáztunk. Az agaróz-blokkokat megszilárdulásig hűtőbe helyeztük. Szilárdulás után a blokkokat 1 ml CPE

pufferben 30 °C-on 1 órán át rázatás nélkül, majd 3x15 percig 1 ml 50 mM EDTA-ban (pH 9,0) szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az utolsó mosás után a blokkokat 1 ml proteináz-K-t tartalmazó lízis oldatba (1,1 ml Solution 3 + 1,1, mg proteináz-K/ 1 minta) helyeztük és 37 °C-on gyenge rázatás mellett (50 rpm) 3 órán keresztül inkubáltuk. Ráztatás után a blokkokat 1 ml 50 mM EDTA-ban (pH 9,0) 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd a blokkokat 0,5 M EDTA-ban (pH 9,0) 4 °C-on tároltuk (Doi és munkatársai 1992).

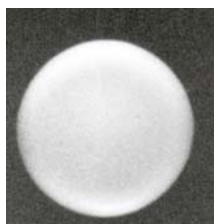
4. Eredmények és értékelés

4.1. Protoplasztképzés és fúzió

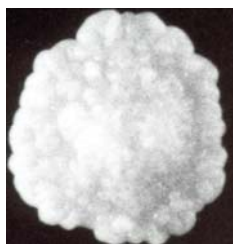
Candida albicans vad típusú (ATCC 10261) törzséből indukált mutagenézissel (NTG, UV) hoztuk létre a kétszeresen auxotróf vad típusú és telepmorfológiai mutánsokat. A fonalas formát képző törzsből protoplaszton keresztül uv sugárzással hoztuk létre az adenin auxotróf törzset. A telepmorfológiai mutánsok és a sima telepeket képező törzsek között Ca^{2+} -PEG indukálta protoplasztfúzióval létrehozott fúziók közül háromnál (I-II-III) a hibridek sima felszínű telepeket képeztek, amelyek csak blasztospórát tartalmaztak. A negyedik fúzió esetében (IX fúzió) a hibridek ún. „irregular-wrinkle” telepeket képeztek és átmeneti, megnyúlt sejtípust tartalmaztak (táblázat).

A telepmorfológiai mutánsok közötti fúziók közül az egyiknél (V fúzió) a létrejött hibridek csak blasztospórát tartalmazó, sima felszínű telepeket képeztek. A másik fúzió (X fúzió) izolált 10 klónja közül kilenc „irregular-wrinkle” telepeket képzett, amelyek csak átmeneti, megnyúlt sejtet tartalmaztak. Azonban egy klón, annak ellenére, hogy az egyik szülő valódi fonalas formát képzett, csak blasztospórát tartalmazó sima felszínű telepeket hozott létre (.táblázat). A X fúzió kapott hibridjeinek sajátosságos telep- és sejtmorfológiája alapján ezen fúzió két kiválasztott hibridjét és szülői törzseit használtuk a további kísérletes munkákhoz, amelyek telepfotóit az ábra mutatja..

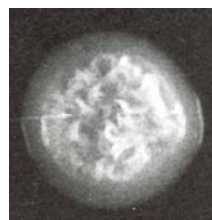
.táblázat	A szomatikus hibridizációval létrehozott hibridek jellemzői			
Kód	Szülői törzsek		Telepmorfológia	Sejttípus
HIS	S4	M3	Sima	blasztospóra
HIIS	S4	M4	Sima	Blasztospóra
HIIS	S2	M5	Sima	Blasztospóra
HVS	M4	M5	Sima	Blasztospóra
HIXM	S3	M2	„irregular-wrinkle”	Megnyúlt sejt
H1M	M2	M4	„irregular-wrinkle”	Megnyúlt sejt
H9S	M2	M4	sima	Blasztospóra



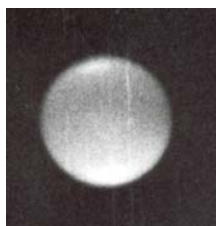
ATCC 10261



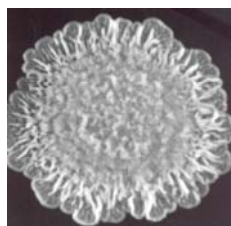
M2



M4



H1M



H9S

A *Candida albicans* törzsek közötti protoplaszt fúzió még ma is alapját képezi a klasszikus genetikai vizsgálatoknak. Az eltérő genomok egyesítésének egyetlen módja a protoplaszt fúzió. Az első *Candida* fúzió az 1970-es évek végén történt *Candida tropicalis*sal (Fournier és munkatársai 1977, Vallin és Ferenczy 1978).

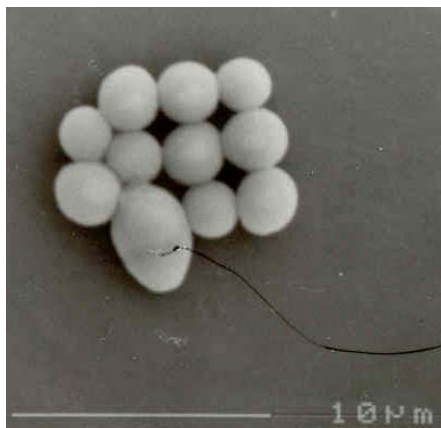
A telepmorfológiai mutánsok és a sima felszínű telepeket képző törzsek között létrehozott sima felszínű, csak blasztospórákat képző hibridek (I-II-III) azt bizonyítják, hogy a morfomutációért felelős gének recesszíven öröklődtek. Hasonló eredményeket publikáltak Nombela és munkatársai (1987). A sima felszínű telepeket és a fonalas formát képző telepmorfológiai mutáns között létrehozott hibrid (IX) egy új, átmeneti sejttípust tartalmazó telepmorfológiai mutánst eredményezett, amely a szülői auxotrófiák között bekövetkezett komplementáció miatt prototróffá vált. Ebben az esetben a szegregációért felelős gén domináns öröklésmentet mutatott.

A telepmorfológiai mutánsok között létrehozott hibridek az V fúzió esetében sima felszínű telepeket képeztek, amelyek csak blasztospórákat tartalmaztak. Ebben az esetben a morfomutációért felelős gének között komplementáció következett be. A X fúzió esetében a telepmorfológiai mutánsok között létrehozott hibridek – a IX hibridhez hasonlóan – átmeneti, megnyúlt sejttípust tartalmazó, rögzös felszínű telepeket képeztek. Ebben az esetben nem

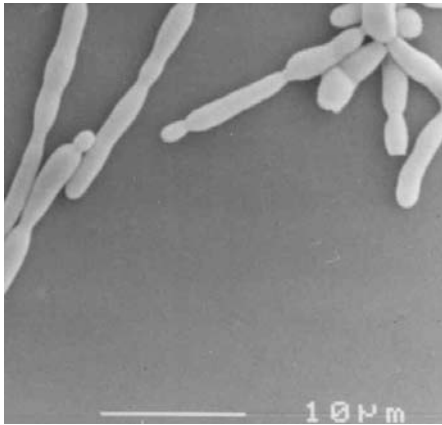
következett be komplementáció a morфомutációért felelős gének között. A X fúzió hibridjei között egyetlen olyan telepet sikerült izolálnunk, amelyik sima felszínű telepeket képzett és csak blasztospórát tartalmazott. Ez azt bizonyítja, hogy nem történt komplementáció a morфомutációért felelős gének között. Gil és munkatársai telepморfológiai mutánsok keresztezésével szintén két fajta hibridet kaptak: az egyik rögzös telepморfológiájú volt és és fonalas növekedésre képes, míg a másik sima telepморfológiájú, csak blasztospórát képző (Gil és munkatársai 1988).

4.2. Pásztázó elektron mikroszkópos képek

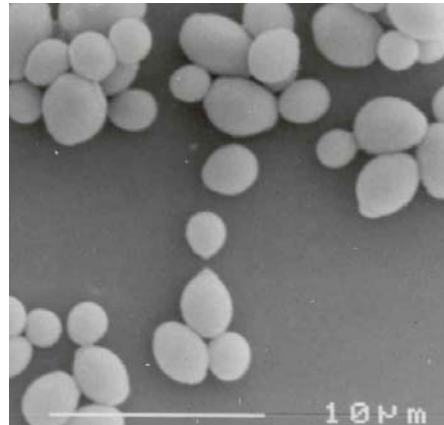
A kiindulási ATCC 10261 törzs, a 170/2/2 telepморfológiai mutáns (szülői törzs) és a X/9 sima telepeket létrehozó hibrid blasztospórái hasonló méretűek voltak; átlagos átmérőjük 2,5 μm volt (... ábra). A valódi hifát képző M2 telepморfológiai mutáns hifáinak átlagos átmérője 2 μm volt (1,5-2,5 μm), míg a hosszúsága 6-20 μm között változott (ábra). Az „irregular-wrinkle” telepeket képző X/1 hibrid egy teljesen új, megnyúlt sejtípust hozott létre, amelyeknek átlagos átmérője 2 μm , hosszúsága 6 μm volt (... ábra). Mindkét hibrid sejtjeire jellemző, hogy osztódás után az utódsejt leválik az anyasejtről és a sejtek főként magányosan fordulnak elő.



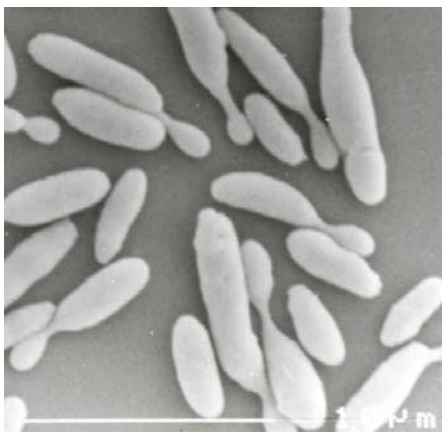
ATCC 10261



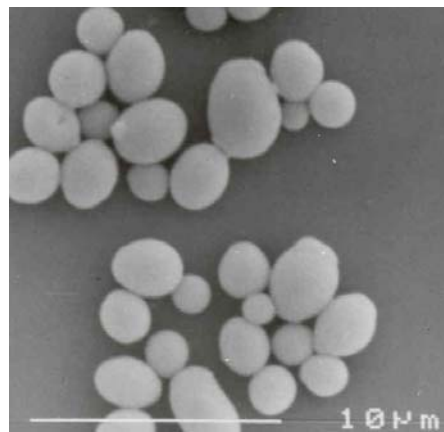
M2



M4



H1M



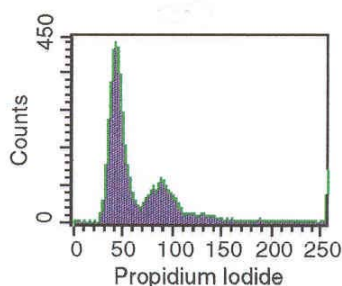
H9S

A *Candida albicans* telepmorfológiája összefüggést mutat a telepeket alkotó sejtek típusával. A sima felszínű telepeket képző *Candida albicans* törzseink csak blasztospórákat tartalmaztak, amely megegyezik más szerzők megfigyeléseivel (Radford és munkatársai 1994, Pesti és munkatársai 1999). A szabályos vagy szabálytalan rögös *Candida albicans* törzseink telepei a pszeudohifa és a blasztospóra különböző arányait tartalmazták. Már az 1970-es évek elején elvégzett pásztázó elektron mikroszkópos felvételek is azt sugallták, hogy a rögös telepek elsősorban pszeudohifát tartalmaznak (Joshi és munkatársai 1975, Whittaker és Drucker 1970).

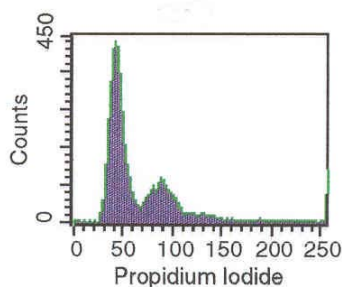
Az egyes sejtípusok felszíni struktúrái az egy sejtről készült pásztázó elektron mikroszkópos képek segítségével válnak összehasonlíthatóvá. Mind a blasztospórák, mind a pszeudohifák és a valódi hifák felszíne sima, kivételt a switching jelenségét mutató ún. opaque telepek sejtjei képeznek, amelyek felszínén ún. „szemölcsök” találhatók. A szemölcsök szerepe még ma sem tisztázott, valószínű, hogy csatornaként működve összekötik a citoplazmát a külső környezettel Soll és munkatársai 1991, Soll 1992).

4.3. DNS mennyiségi meghatározás flow citométerrel

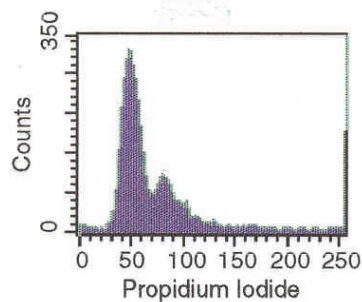
A *Candida albicans* gomba diploid genommal rendelkezik. A flow citométeres mérések alapján a két kiválasztott szülői törzs a kiindulási törzzsel egyezően, diploid genommal és azonos DNS mennyiséggel rendelkezik. A két kiválasztott hibrid DNS tartalma azonban nem egyezik meg a szülői törzsek DNS-ének mennyiségével. A hibridek DNS tartalma kevesebb, mint a kiindulási vagy a szülői törzseké. A két hibrid DNS-ének mennyisége különbözik egymástól, a H1M hibrid több DNS-t tartalmaz, mint a H9S törzs (.....ábra).



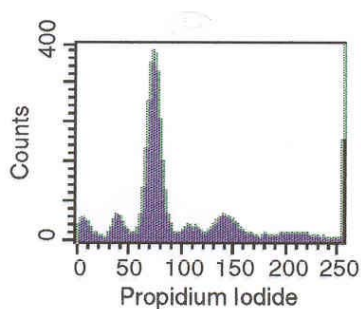
A



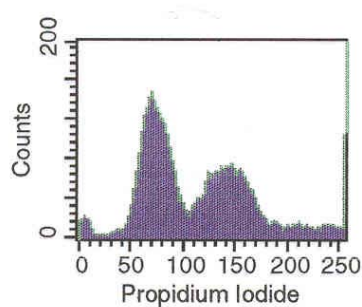
B



C



D



E

...ábra A flow citométeres mérések eredményei a kiindulási, a két szülői és a két hibrid esetében.

A: S1 B: M2 C: M4 D: H1M E: H9S

A *Candida albicans* diploid gomba, amelynek genomja ~16 millió bázispár nagyságú (DeBacker és munkatársai 2000).

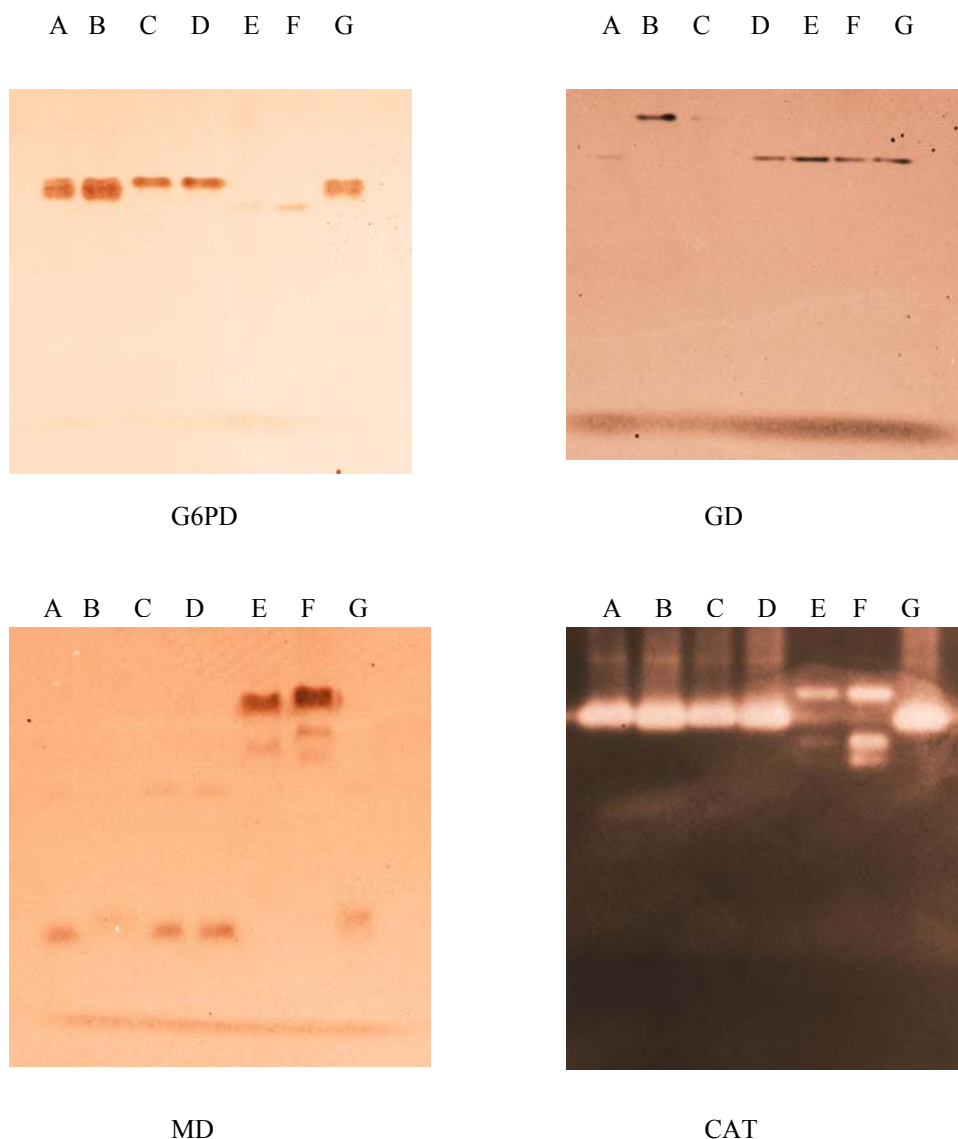
Több szerző is végzett DNS mennyiségi meghatározást áramlási citometriával különböző *Candida albicans* törzseknél (Dvorak és munkatársai 1987, Stöver és munkatársai 1998), azonban a szakirodalomban nem találtunk arra vonatkozó adatot, hogy összehasonlítás történt a *Candida albicans* törzsek és azok fúziójából származó hibridek között.

Az általunk végzett mérések sugallták, hogy a diploid genommal rendelkező *Candida albicans* törzsek fúziójával létrejött tetraploid hibridek átmeneti $4n$ kromoszómaszámmal rendelkeztek. Valószínű, hogy ennek az állapotnak az instabilitása miatt létrejött haploidizáció okozta a hibrideknél tapasztalt csökkent DNS mennyiséget (Sarachek és munkatársai 1981).

4.4. Izoenzim vizsgálat

Négy fajta izoenzim mintázatát vizsgáltuk: glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz, kataláz, glutamát-dehidrogenáz, malát-dehidrogenáz. A kiindulási törzsünk és a két szülői törzs azonos mintázatot mutatott mind a négy vizsgált izoenzim esetében. A H9S hibrid mintázata megegyezett a szülői törzsekével, míg a H1M hibrid mintázata különbözött a többi mintázattól. A G6PD és a GD esetében egyetlen állélt lehetett megfigyelni mind az öt törzs

esetében. A CAT enzimnél a kiindulási, a két szülői és a H9S törzs egyetlen sávot adott, amelyek azonosak voltak, ugyanakkor a H1M törzsnél három sávot lehetett megfigyelni, melyek közül egyik sem volt azonos a másik négy törzssével. A MD enzim vizsgálatánál az előző enzimmel azonos eredményeket kaptunk (....ábra).



Jelmagyarázat: A: ATCC 10261, B: M2, C: M4, F: H1M, G: H9S

Az elektroforézissel elvégzett izoenzim analízis hatásos eszköze a génexpresszó szintjén történő genetikai variabilitás feltérképezésének (Reynes és munkatársai 1996). Az izoenzim markerek nagyfokú stabilitása miatt Lehmann, az izoenzim vizsgálatot összehasonlítva más, a genetikai variabilitás kimutatására alkalmas módszerekkel (DNS-próbák, RFLP), az előbbi ajánlja a törzsek elsődleges jellemzésére (Lehmann és munkatársai 1989).

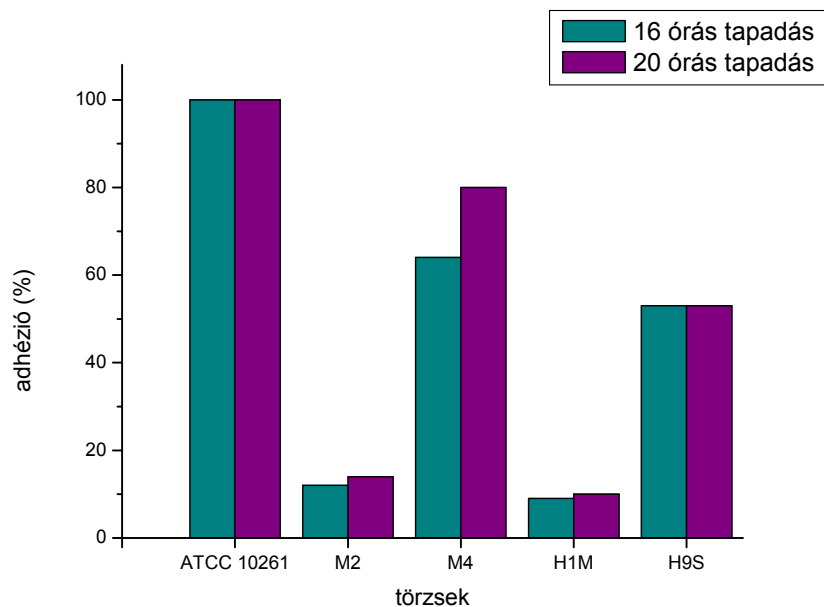
A kiindulási és az abból származó szülői törzsek között mintázatkülönbséget nem lehetett megfigyelni. Hasonló eredményeket publikáltak indukált mutagenézissel létrehozott morfológiai mutánsoknál (Pesti és munkatársai 2001), illetve HIV pozitív betegekből izolált spontán morfológiai mutánsok esetében is (Reynes és munkatársai 1996). A G6PD és a GDH esetében csak egyetlen allélt tudtunk detektálni a vizsgált törzsek mindegyikében, bár Caugant és Sandven az általuk vizsgált *Candida albicans* törzsek 48 %-ban allélpárt mutattak ki (Caugant és Sandven 1993). Az MDH esetében heterozigota allélpárt detektáltunk, bár a H1M törzsnél 3 sávot lehetett megfigyelni, hasonlóan a CAT enzimhez.

4.5. Kötődés akrilátfelszínhez

A kiindulási törzsünket kontrollként használva, ehhez viszonyítottuk a két szülői és a két hibrid törzs tapadási képességét. A 16 és 20 órás tapadási eredmények szignifikáns különbséget nem mutattak. A csak fonalas formát képző szülői törzs tapadása akrilátfelszínhez gyenge volt és a H1M hibrid tapadása is ehhez hasonló eredményt adott. A másik szülői törzs adhéziója a kiindulási törzshez közelített és ehhez hasonló eredményt mutatott a H9S hibrid is. (....táblázat,ábra)

..... táblázat A vizsgált törzsek akrilátlapos adhéziójának 16 és 20 órás eredményei

Törzsek	Sejttípus	Eredmények (%)	
		16 órás	20 órás
S1	100 % blasztospóra	100	100
M2	100 % hifa	12	14
M4	80 % blasztospóra 20 % pseudohifa	64	80
H1M	100 % megnyúlt blasztospóra	9	10
H9S	100 % blasztospóra	53	53



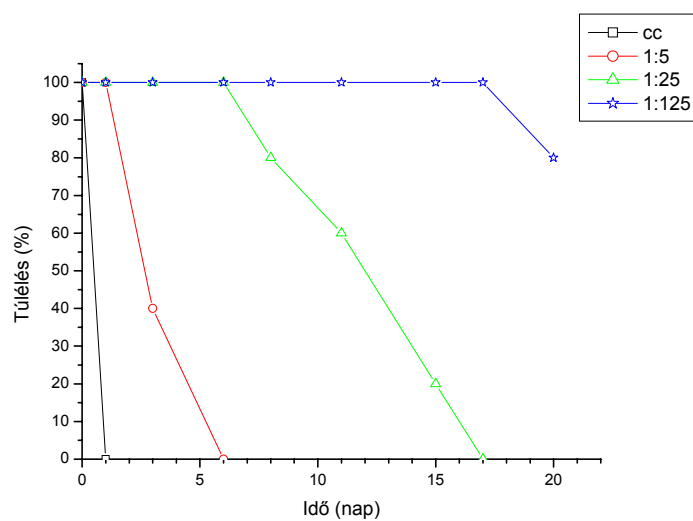
.... ábra Az akrilátlapos adhézio eredményei

4.6. Patogenitásvizsgálat egérben

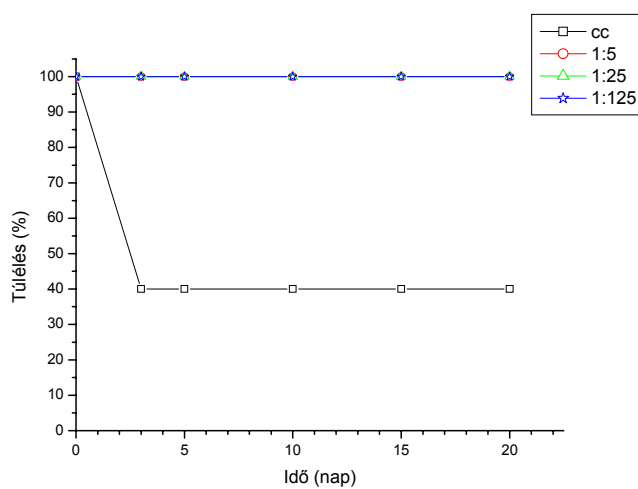
Mind az öt törzs patogénnek bizonyult, bár a törzsek virulenciája nagyfokú különbséget mutatott. Legnagyobb virulenciával a kiindulási törzs rendelkezett, míg legkevésbé virulens az átmeneti sejtípust képező H1M hibrid volt. A kiindulási törzs még 4×10^6 CFU értéknél is 100 %-os elhullás okozott, míg a fonalas szülői törzs és a H1M hibrid 10^8 CFU értéknél sem okozta az állatok teljes elhullását. Az M2 és a H1M, valamint az M4 és H9S törzsek virulenciája hasonló volt (...táblázat,ábra).

....táblázat Az egerek elhullási aránya a különböző koncentrációknál

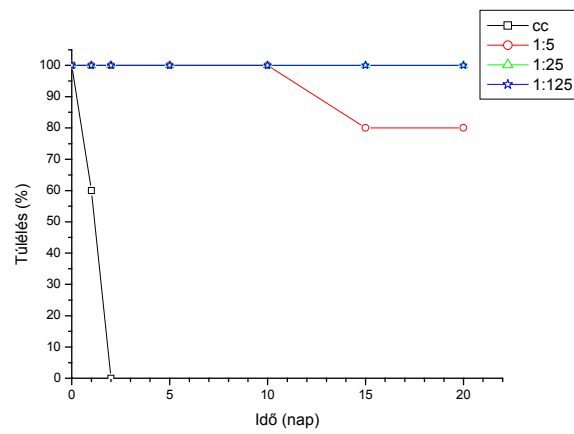
Törzsek	Elhullási arány a különböző koncentrációknál			
	cc. ($5 \times 10^7 / 500 \mu\text{l}$)	1:5 ($10^7 / 500 \mu\text{l}$)	1:25 ($2 \times 10^6 / 500 \mu\text{l}$)	1:125 ($4 \times 10^5 / 500 \mu\text{l}$)
S1	100 %	100 %	100 %	20 %
M2	60 %	0 %	0 %	0 %
M4	100 %	20 %	0 %	0 %
H1M	40 %	0 %	0 %	0 %
H9S	100 %	40 %	0 %	0 %



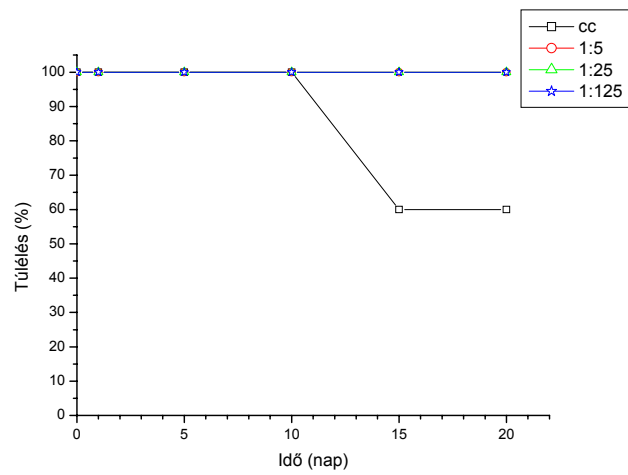
....ábra Túlélés az törzs esetében



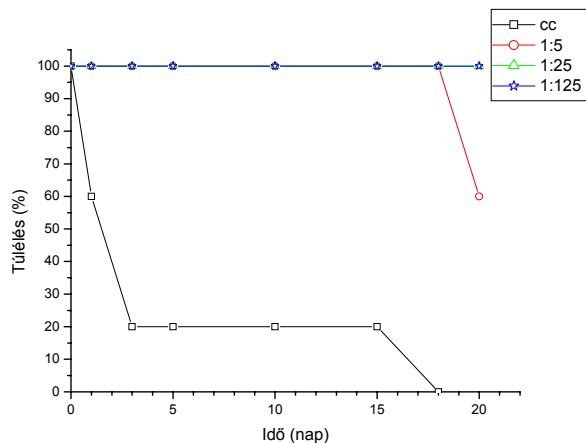
...ábra Túlélés az M2 törzs esetében



...ábra Túlélés az M4 törzs esetében



...ábra Túlélés a H1M törzs esetében



...ábra Túlélés a H9S törzs esetében

A 21. nap után a túlélőket felboncoltuk és kerestük a *Candida albicans* okozta változásokat. A kiindulási törzzsel oltott túlélő egerek közül egynél idegrendszeri tüneteket figyeltünk meg, egy egernél a bal vese, egy egernél a jobb vese és két egernél mindkét vese tályogos volt. Az M2, az M4 és a H1M törzsekkel oltott túlélő egereknél szemmel látható elváltozást nem tapasztaltunk. A H9S törzzsel oltott túlélő egerek közül hatnál nem volt szemmel látható elváltozás, két-két egernél a jobb illetve a bal vese, míg három egernél mindkét vese tályogos volt.

A klinikai gyakorlatban a *Candida albicans*-t a szepszist okozó négy leggyakoribb ok között tartják nyilván (Haynes 2001) és mind az Egyesült Államokban, de máshol a világon is a nozokomiális infekciók negyedik vezető oka (Calderone és Fonzi 2001).

A virulencia hátterében álló genetikai folyamatok megismerése eltérő virulenciájú mutáns törzsek tanulmányozásán alapszik állatkísérletek segítségével (Navarro-Garcia 2001). A leggyakrabban használt modell állatok az egerek, bár használnak patkányt (Meitner és munkatársai 1990, Cole és munkatársai 1995) és tengeri malacot is (Riggle és munkatársai 1999).

A *Candida albicans* különböző megjelenési formáival (blasztospóra, pseudohifa, valódi hifa) elvégzett patogenitási-virulencia vizsgálatok eredményei ellentmondásosak a szakirodalomban. Shepherd (1985) kísérleteiben mind a sarjadzó, mind a fonalas forma

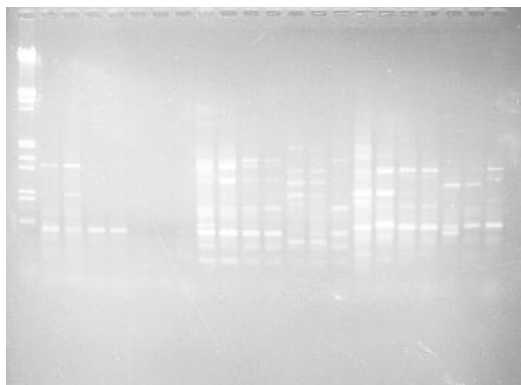
virulensnek bizonyult, ha a vizsgált törzs nem rendelkezett auxotrófiával. Ha azonban a törzs auxotróf volt, a törzs virulenciája is csökkent, illetve ezek az auxotrófok némely esetben apatogének voltak. Kirsch és Whitney (1991) hasonló eredményeket kaptak, és eredményeik szerint a virulencia összefüggést mutatott az auxotrófiával. Az adenin auxotróf törzsek rendkívül alacsony virulenciát mutattak, míg azok a prototrófok, amelyek ADE2 gént hordoztak magas kópiaszámú autonóm replikálódó vektoron, megnövekedett virulenciájúak voltak. Kísérletünkben hasonló eredményt kaptunk: az adenin auxotrófiájú szülői törzs bizonyult a legkevésbé virulensnek. Kirsch és Whitney (1991) ugyanakkor nem talált különbséget a virulenciában a leucin auxotróf és prototróf törzsek között, ami azt sugallja, hogy a leucin auxotrófiát okozó mutáció nincs hatással a virulenciára. Ezzel ellentétben Lo és munkatársai (1997) és Andrutis és munkatársai (2000) azt tapasztalták, hogy a fonalas formát nem képző törzs kevésbé virulens, mint a fonalas formát képző. Andrutis és munkatársai két törzset vizsgáltak: ez egyik két, a fonalas forma képzéséhez szükséges génben hiányos volt: EFG1 és CPH 1, emiatt ez a törzs képtelen volt a fonalas forma képzésére (Köhler és Fink 1996, Stoldt és munkatársai 1997) és csökkent virulenciát mutatott. A másik törzs EFG1⁺ volt, képes volt fonalas forma képzésére és állatkísérletben a kontroll törzshöz hasonló magas virulenciát mutatott. Lo és munkatársai (1997) szintén EFG1 és CPH1 gén hiányos törzsekkel dolgoztak, amelyeket avirulensnek találtak. Diez-Orejas és munkatársai (1999) is fonalas növekedésre képtelen törzsek virulenciáját vizsgálták. Eredményeik szerint a törzs csökkent virulenciájú volt és kevésbé tudta kolonizálni a kísérleti egerek szerveit (vese, agy), amelyet a szerzők a csökkent szöveti kötődéssel magyaráztak.

Kísérleteinkben a fonalas forma képzésére képes *Candida albicans* törzs virulensnek bizonyult.

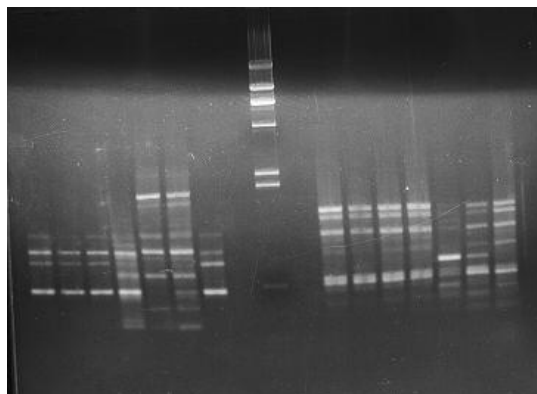
Az eltérő eredmények feltételezhető oka a gomba különböző megjelenési formáin expresszálandó eltérő antigén determinánsokban kereshető. A *Candida albicans* különböző megjelenési formái és a virulencia kapcsolata az eddig elvégzett nagyszámú molekuláris biológiai elemzések ellenére sem tisztázott (Kobayashi és Cutler 1998).

4.7. RAPD-PCR vizsgálat

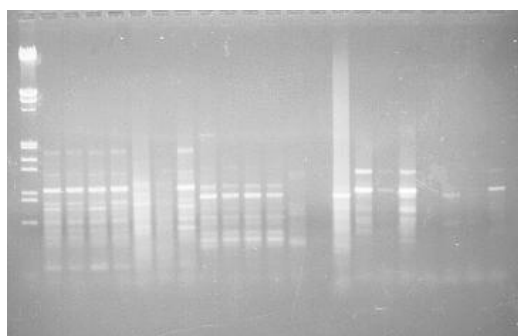
A vizsgált primereknél öt esetben (OPC 02, OPC 05, OPC 18, OPC 19 és OPC 20) a kiindulási és a szülői törzsek azonos mintázatot mutattak. A H1M törzs mintázata egyetlen primer esetében sem egyezett meg a másik négy törzs mintázatával, bár hasonlóságot mutatott az M2 fonalas szülői törzs mintázatával. A H9S törzs mintázata egyetlen esetben (R 108) azonos volt az M4 szülői törzs mintázatával, a többi esetben a két törzs hasonló mintázatot mutatott. A legnagyobb mértékű polimorfizmust az R 108 primer okozta (ábra).



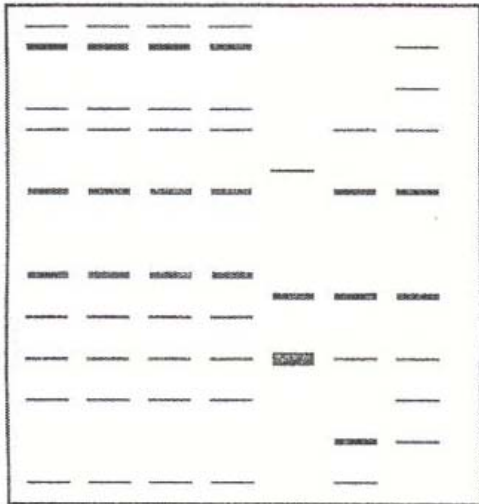
OPC10, OPQ06, R108



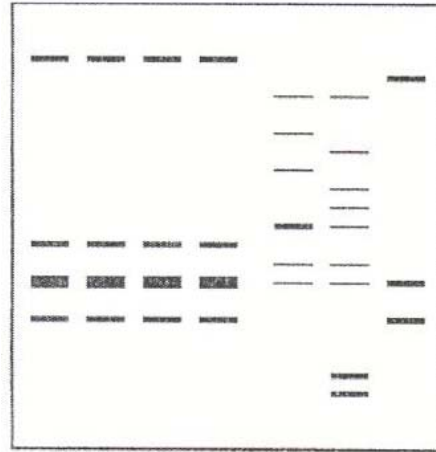
OPC14, OPC20



OPC2, OPC5, OPC8



OPC18



OPC19

A RAPD-PCR alapja a 10 bázispárból álló oligonukleotidok, mint primerek felhasználása a DNS amplifikálásában (Williams és munkatársai 1991). A DNS amplifikálásának ez a módja különbözik az általában használatos módszerektől: egyrészt, mert egyetlen primert használunk, másrészt nincs szükség a genomikus szekvencia ismeretére (Innis és munkatársai 1990).

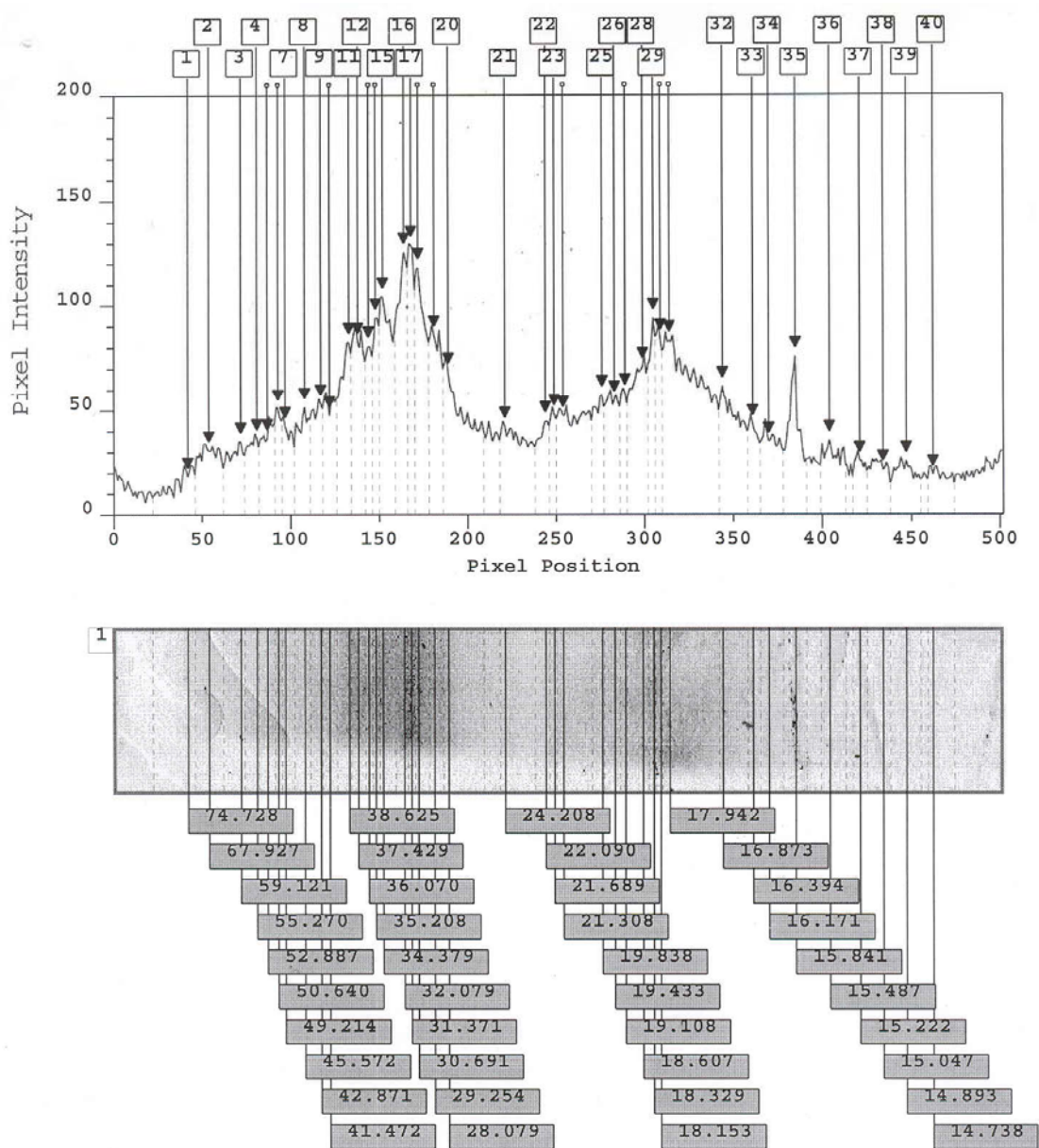
Az általunk nyolc különböző primerrel elvégzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a törzseink hasonló mintázattal rendelkeznek. Különböző *Candida albicans* törzsek összehasonlító RAPD-PCR vizsgálatával Lehmann és munkatársai (1992) azt tapasztalták, hogy a mintázatban számos olyan sáv detektálható, amely az összes, általuk vizsgált törzs mintázatában előfordul. Megfigyelték, hogy a magas intenzitású sávok a repetitív DNS szekvenciák amplifikálásának köszönhetők, míg az alacsony intenzitású sávok a primer és a célszekvencia közötti ún. „mismatch” kapcsolódás miatt jönnek létre. A RAPD mintázatok közötti magas genetikai homogenitást figyeltek meg Takasuka és munkatársai (1998), Pesti és munkatársai (2001), valamint Jain és munkatársai (2001). Utóbbiak összefüggést találtak a flukonazol érzékeny törzsek közötti genetikai homogenitás és ezen törzsek *in vitro* flukonazol érzékenysége között.

A törzsek mintázata között tapasztalható hasonlóság ellenére a módszer gyorsasága, egyszerűsége és reprodukálhatósága miatt alkalmas a gomba identifikálására még kevert tenyészet esetén is (Steffan és munkatársai 1997), ugyanis a mintázatban levő eltérő

fragmenteket, mint genetikailag meghatározott jegyeket felhasználhatjuk (Lehmann és munkatársai 1992).

4.8. SDS-PAGE vizsgálat

A legnagyobb mértékű fehérje mintázatot a kiindulási törzs mutatta. A két szülői törzs azonos mintázatot mutatott, azonos mennyiségű fehérje sávval. A H1M hibrid fehérje sávjainak száma a szülői törzsekéhez volt hasonló. A legkevesebb fehérje sávval a H9S hibrid rendelkezett (...ábra).

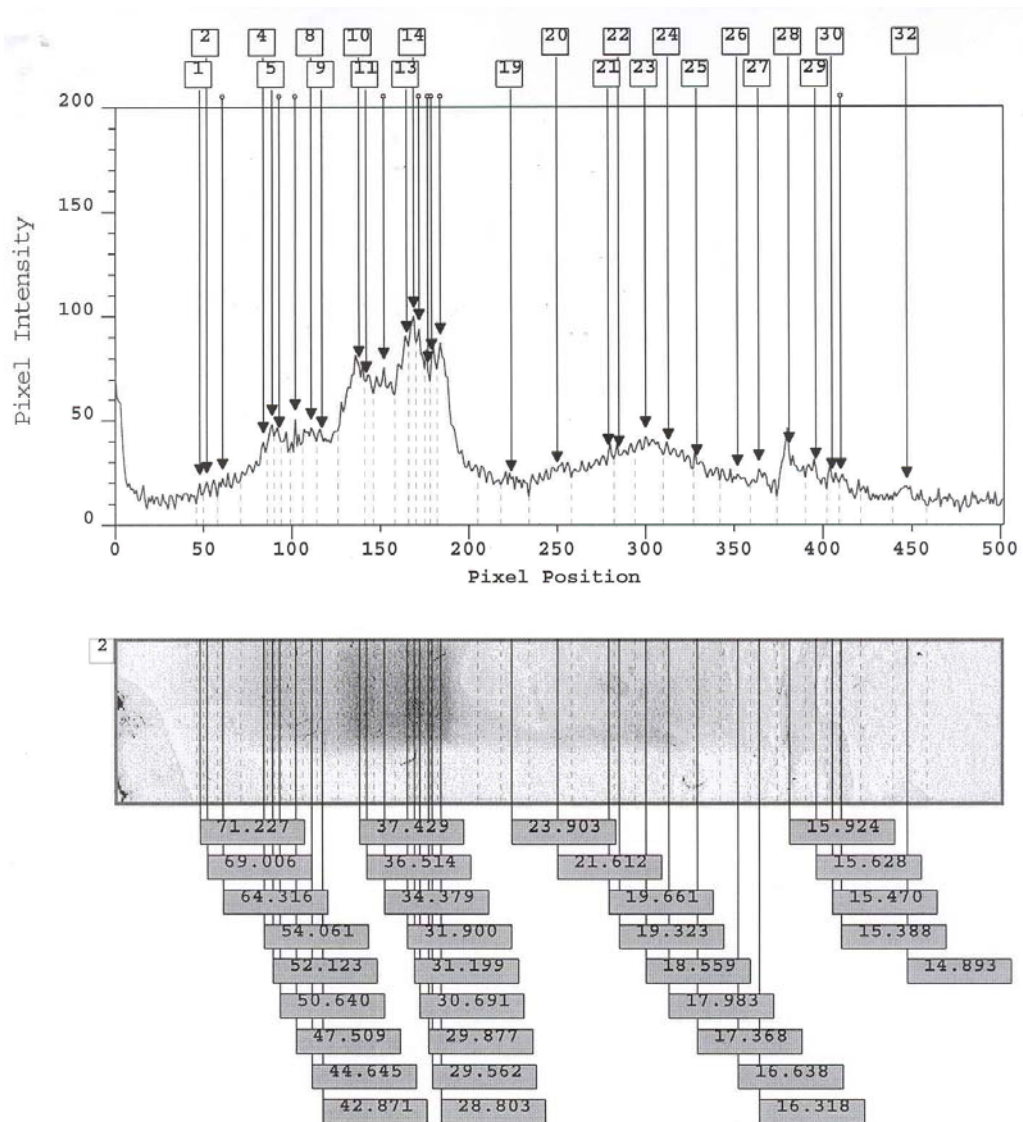


...ábra

Az ATCC 10261 törzs fehérjemintázata

....táblázat Az ATCC 10261 törzs fehérjemintázatának kiértékelése.

Band	Raw Volume	Peak	Band %(Raw)	MW (kd)	Rf
1	32 650,00	18,10	1,64	74.728	0,08
2	44 002,00	30,26	2,21	67.927	0,11
3	32 686,00	34,59	1,64	59.121	0,14
4	25 210,00	36,20	1,27	55.270	0,16
5	32 541,00	36,59	1,64	52.887	0,17
6	17 948,00	50,53	0,90	50.640	0,19
7	26 925,00	42,04	1,35	49.214	0,19
8	36 228,00	50,87	1,82	45.572	0,22
9	32 747,00	53,23	1,65	42.871	0,23
10	40 408,00	46,86	2,03	41.472	0,24
11	51 384,00	82,35	2,58	38.625	0,26
12	62 522,00	81,88	3,14	37.429	0,27
13	29 123,00	80,50	1,46	36.070	0,29
14	32 464,00	93,76	1,63	35.208	0,29
15	79 013,00	103,66	3,97	34.379	0,30
16	70 788,00	125,06	3,56	32.079	0,33
17	47 273,00	129,14	2,38	31.371	0,33
18	77 091,00	117,59	3,87	30.691	0,34
19	62 825,00	85,77	3,16	29.254	0,36
20	111 193,00	68,32	5,59	28.079	0,38
21	69 505,00	42,26	3,49	24.208	0,44
22	29 018,00	44,29	1,46	22.090	0,49
23	17 595,00	48,30	0,88	21.689	0,50
24	88 291,00	46,86	4,44	21.308	0,51
25	33 741,00	56,83	1,70	19.838	0,55
26	46 254,00	54,43	2,32	19.433	0,56
27	21 357,00	57,94	1,07	19.108	0,58
28	73 230,00	70,72	3,68	18.607	0,60
29	30 165,00	93,45	1,52	18.329	0,61
30	32 473,00	84,02	1,63	18.153	0,62
31	205 746,00	82,68	10,34	17.942	0,63
32	74 164,00	61,40	3,73	16.873	0,69
33	27 116,00	42,88	1,36	16.394	0,72
34	43 977,00	34,24	2,21	16.171	0,74
35	53 328,00	75,71	2,68	15.841	0,77
36	38 342,00	35,56	1,93	15.487	0,80
37	18 609,00	25,64	0,94	15.222	0,84
38	28 732,00	20,99	1,44	15.047	0,86
39	33 394,00	25,41	1,68	14.893	0,89
40	26 993,00	18,95	1,36	14.738	0,92
41	52 914,00	0,00	2,66	None	-1,00

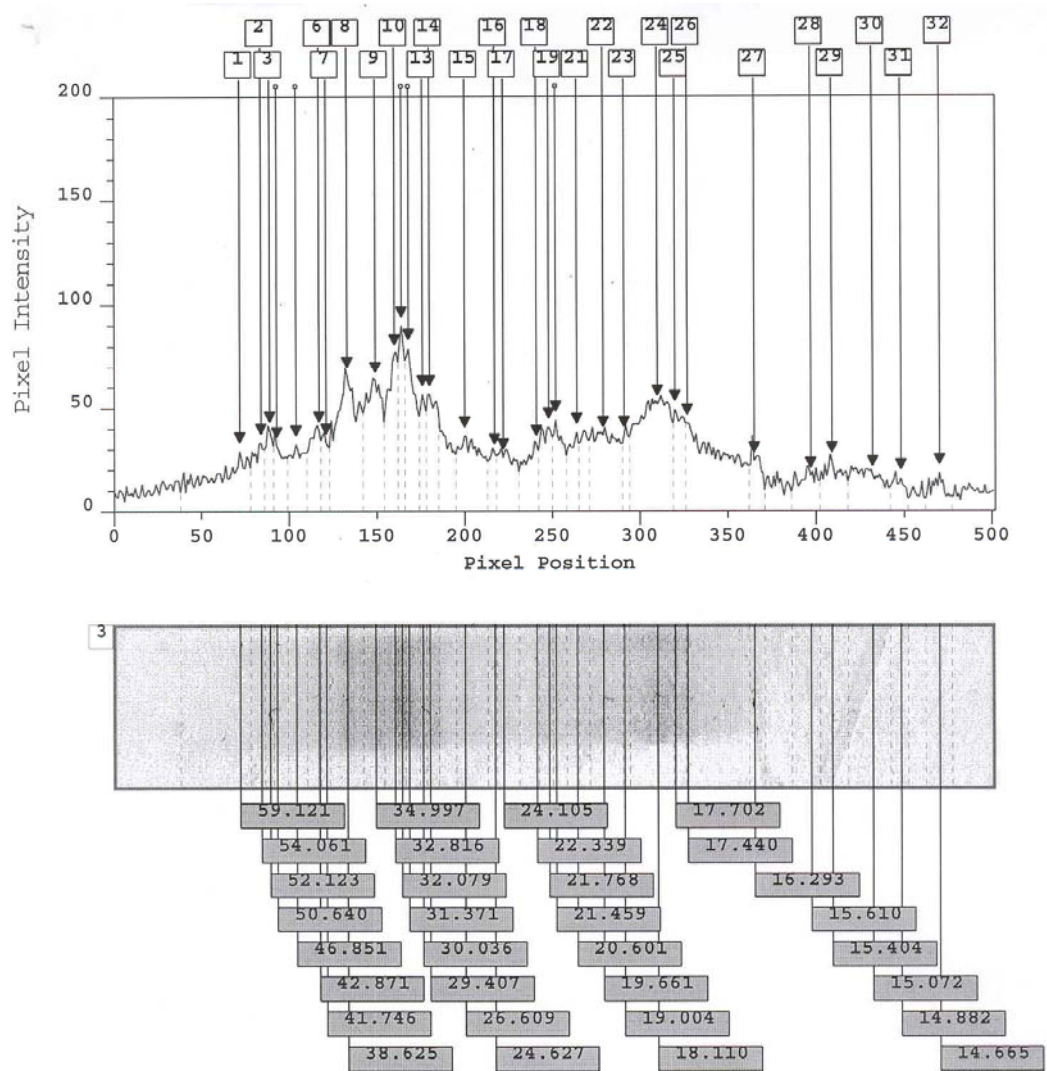


...ábra

Az M2 törzs fehérjemintázata.

....táblázat Az M2 törzs fehérjemintázatának kiértékelése.

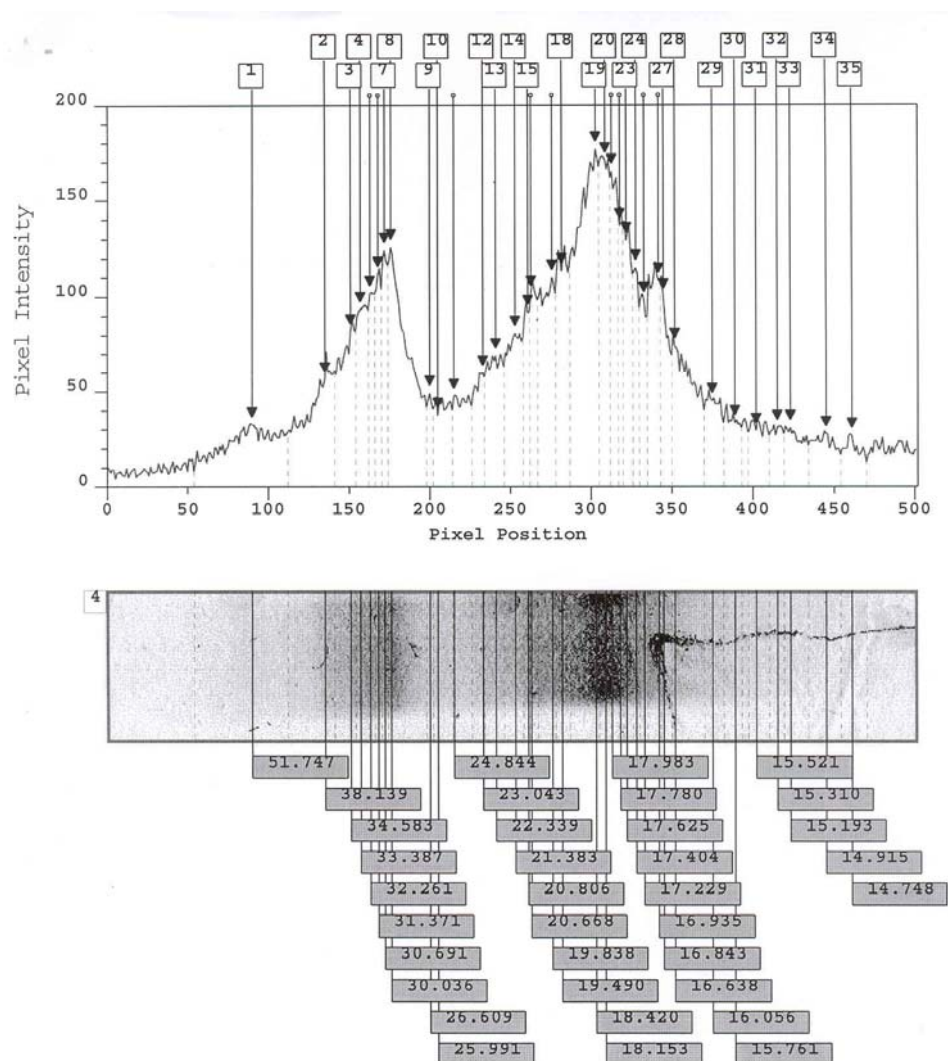
Band	Raw Volume	Peak	Band % (Raw)	MW (kd)	Rf
1	5 482,00	19,95	0,44	71.227	0,10
2	13 242,00	20,69	1,06	69.006	0,10
3	24 106,00	21,73	1,93	64.316	0,12
4	40 147,00	39,54	3,22	54.061	0,17
5	16 188,00	47,54	1,30	52.123	0,18
6	16 429,00	41,91	1,32	50.640	0,19
7	26 265,00	50,18	2,11	47.509	0,20
8	32 736,00	46,64	2,62	44.645	0,22
9	47 255,00	41,68	3,79	42.871	0,23
10	92 594,00	76,51	7,42	37.429	0,27
11	32 782,00	68,64	2,63	36.514	0,28
12	76 093,00	75,51	6,10	34.379	0,30
13	58 079,00	87,84	4,66	31.900	0,33
14	35 208,00	99,26	2,82	31.199	0,34
15	40 558,00	93,50	3,25	30.691	0,34
16	21 804,00	74,04	1,75	29.877	0,35
17	29 310,00	79,19	2,35	29.562	0,36
18	103 952,00	86,86	8,33	28.803	0,37
19	31 222,00	20,88	2,50	23.903	0,45
20	54 280,00	25,22	4,35	21.612	0,50
21	64 793,00	33,67	5,19	19.661	0,56
22	39 195,00	32,55	3,14	19.323	0,57
23	57 484,00	42,46	4,61	18.559	0,60
24	53 374,00	36,62	4,28	17.983	0,62
25	38 261,00	28,93	3,07	17.368	0,66
26	35 166,00	23,80	2,82	16.638	0,70
27	29 576,00	25,84	2,37	16.318	0,73
28	43 367,00	34,31	3,48	15.924	0,76
29	27 516,00	26,67	2,21	15.628	0,79
30	14 734,00	21,88	1,18	15.470	0,81
31	20 630,00	21,77	1,65	15.388	0,82
32	25 587,00	17,74	2,05	14.893	0,89



.....ábra Az M4 törzs fehérjemintázata.

....táblázat Az M4 törzs fehérjemintázatának értékelése.

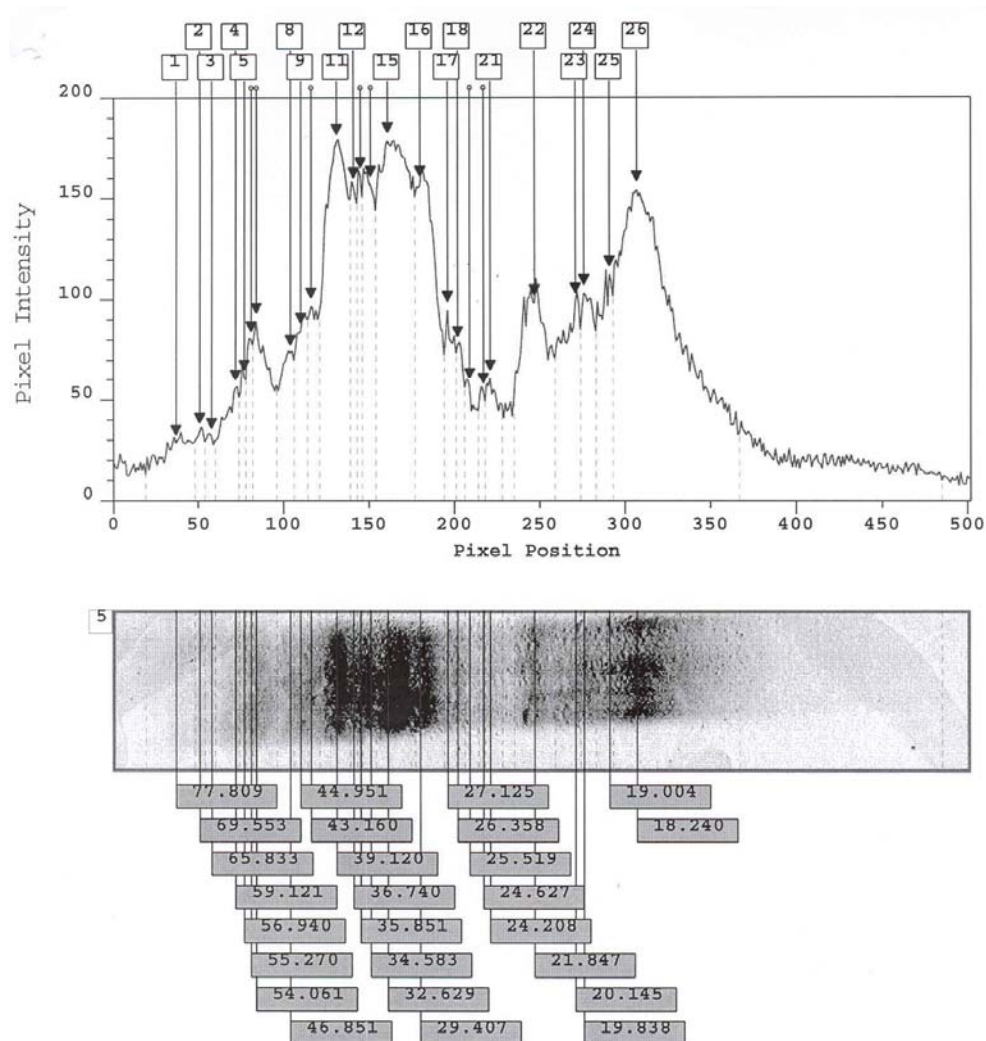
Band	Raw Volume	Peak	Band %(Raw)	MW (kd)	Rf
1	63 937,00	29,07	5,33	59.121	0,14
2	20 705,00	32,62	1,73	54.061	0,17
3	16 634,00	38,93	1,39	52.123	0,18
4	22 117,00	31,30	1,84	50.640	0,19
5	28 541,00	31,82	2,38	46.851	0,21
6	26 494,00	38,84	2,21	42.871	0,23
7	16 161,00	33,17	1,35	41.746	0,24
8	89 525,00	65,47	7,47	38.625	0,26
9	63 418,00	62,77	5,29	34.997	0,30
10	46 497,00	76,29	3,88	32.816	0,32
11	30 503,00	89,64	2,54	32.079	0,33
12	48 838,00	78,62	4,07	31.371	0,33
13	19 277,00	56,60	1,61	30.036	0,35
14	34 590,00	56,17	2,88	29.407	0,36
15	50 749,00	36,05	4,23	26.609	0,40
16	12 466,00	27,64	1,04	24.627	0,43
17	32 232,00	25,14	2,69	24.105	0,44
18	26 415,00	31,86	2,20	22.339	0,48
19	27 468,00	40,51	2,29	21.768	0,49
20	26 952,00	43,43	2,25	21.459	0,50
21	20 836,00	37,86	1,74	20.601	0,53
22	63 412,00	36,50	5,29	19.661	0,56
23	13 729,00	36,63	1,15	19.004	0,58
24	111 905,00	51,13	9,33	18.110	0,62
25	29 520,00	48,95	2,46	17.702	0,64
26	98 374,00	42,22	8,20	17.440	0,65
27	20 284,00	23,61	1,69	16.293	0,73
28	23 347,00	16,19	1,95	15.610	0,79
29	28 231,00	23,52	2,35	15.404	0,81
30	37 908,00	17,49	3,16	15.072	0,86
31	12 346,00	15,24	1,03	14.882	0,89
32	15 249,00	18,11	1,27	14.665	0,94
33	20 310,00	0,00	1,69	None	-1,00



.....ábra A H1M törzs fehérjemintázata.

.... táblázat A H1M törzs fehérjemintázatának kiértékelése.

Band	Raw Volume	Peak	Band %(Raw)	MW (kd)	Rf
1	126 829,00	31,72	2,50	51.747	0,18
2	115 889,00	56,51	2,29	38.139	0,27
3	86 565,00	81,00	1,71	34.583	0,30
4	68 943,00	92,62	1,36	33.387	0,31
5	37 418,00	101,59	0,74	32.261	0,32
6	40 466,00	111,57	0,80	31.371	0,33
7	43 681,00	123,78	0,86	30.691	0,34
8	180 280,00	125,61	3,56	30.036	0,35
9	16 870,00	49,10	0,33	26.609	0,40
10	48 056,00	36,83	0,95	25.991	0,41
11	50 358,00	47,19	0,99	24.844	0,43
12	39 740,00	59,20	0,78	23.043	0,46
13	73 170,00	69,01	1,44	22.339	0,48
14	84 376,00	80,36	1,66	21.383	0,50
15	33 458,00	90,96	0,66	20.806	0,52
16	47 615,00	101,21	0,94	20.668	0,52
17	105 030,00	109,44	2,07	19.838	0,55
18	98 273,00	112,53	1,94	19.490	0,56
19	247 445,00	175,84	4,88	18.420	0,60
20	111 853,00	170,20	2,21	18.153	0,62
21	75 341,00	164,73	1,49	17.983	0,62
22	40 604,00	136,15	0,80	17.780	0,63
23	74 404,00	129,06	1,47	17.625	0,64
24	42 346,00	114,87	0,84	17.404	0,65
25	45 188,00	97,60	0,89	17.229	0,66
26	80 569,00	108,29	1,59	16.935	0,68
27	59 939,00	99,94	1,18	16.843	0,69
28	114 203,00	74,12	2,25	16.638	0,70
29	49 775,00	44,86	0,98	16.056	0,75
30	36 530,00	33,26	0,72	15.761	0,77
31	38 176,00	28,34	0,75	15.521	0,80
32	24 992,00	30,74	0,49	15.310	0,83
33	37 255,00	30,13	0,73	15.193	0,84
34	43 732,00	27,03	0,86	14.915	0,89
35	30 542,00	26,40	0,60	14.748	0,92
36	56 888,00	0,00	1,12	None	-1,00
37	2 563 089,00	0,00	50,56	None	-1,00



....ábra A H9S törzs fehérjemintázata.

....táblázat A H9S törzs fehérjemintázatának kiértékelése.

Band	Raw Volume	Peak	Band %(Raw)	MW (kd)	Rf
1	66 773,00	27,87	2,33	77.809	0,07
2	18 299,00	34,05	0,64	69.553	0,10
3	17 235,00	31,01	0,60	65.833	0,12
4	55 258,00	55,05	1,93	59.121	0,14
5	21 971,00	60,57	0,77	56.940	0,15
6	27 580,00	79,31	0,96	55.270	0,16
7	93 233,00	88,81	3,26	54.061	0,17
8	62 132,00	72,83	2,17	46.851	0,21
9	63 026,00	83,90	2,20	44.951	0,22
10	60 732,00	95,96	2,12	43.160	0,23
11	256 766,00	176,76	8,97	39.120	0,26
12	57 568,00	155,45	2,01	36.740	0,28
13	44 291,00	160,40	1,55	35.851	0,29
14	118 066,00	155,98	4,12	34.583	0,30
15	362 730,00	177,79	12,67	32.629	0,32
16	216 206,00	156,10	7,55	29.407	0,36
17	53 174,00	94,29	1,86	27.125	0,39
18	34 716,00	77,21	1,21	26.358	0,40
19	38 758,00	56,22	1,35	25.519	0,42
20	19 350,00	53,51	0,68	24.627	0,43
21	49 120,00	60,29	1,72	24.208	0,44
22	192 051,00	98,06	6,71	21.847	0,49
23	118 928,00	98,49	4,15	20.145	0,54
24	81 460,00	102,59	2,84	19.838	0,55
25	92 734,00	112,35	3,24	19.004	0,58
26	641 777,00	153,46	22,41	18.240	0,61

4.9. Szegregáció

4.9.1. Spontán szegregáció

A vizsgált 2500 telep közül sem a H1M, sem a H9S törzs esetében nem sikerült szegregánsokat kapni. A hibridek stabilitása 100 % volt.

4.9.2. MIC érték meghatározása

A H1M hibrid MIC értéke p-fluorofenilalanin esetében 350 µg /ml, a H9S törzs esetében 475 µg/ml volt.

4.9.3. Indukált szegregáció

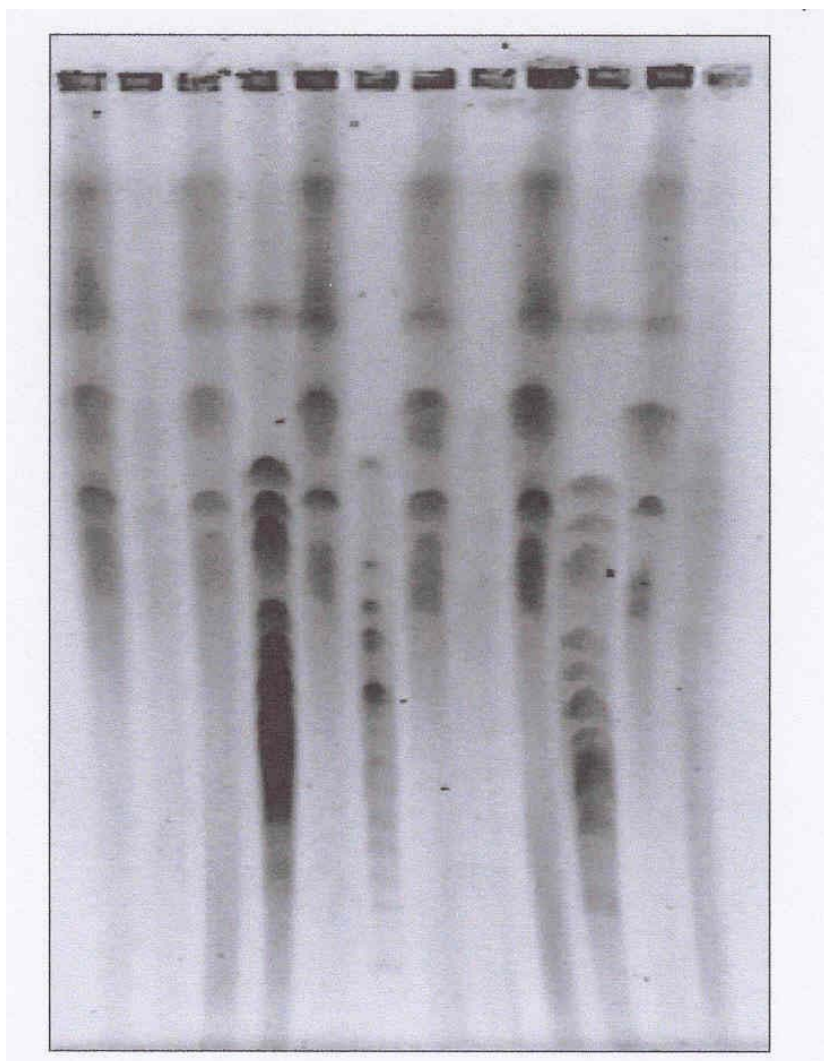
A vizsgált 3500 telepből indukált szegregáció után sem tudtunk a szülői törzsre jellemző szegregánsokat izolálni.

Az, hogy a szülői törzsekre jellemző szegregánst a hibridekből visszanyerni nem tudtunk sem spontán, sem indukált szegregációval, azt mutatja, hogy mindkét hibrid stabilitása 100 % volt. A hibrideknek sem a telep-, sem a sejtmorfológiája nem változott a többszöri átoltás után. Az indukált szegregáció esetében használt para-fluorofenilalanin a sejtekben kromoszómavesztést indukál (Pomes és munkatársai 1987). Az indukált szegregáció „sikertelensége” azt mutatja, hogy a hibridek stabil kromoszóma állománnyal rendelkeznek. A protoplasztfúzió után létrejövő fuzionált sejtmagok egy átalakuláson keresztül vagy mint diploidok stabilizálódnak vagy egy részleges és random haploidizáción keresztül az aneuploidia különböző szintjeire jutnak.. A haploidizációval összefüggő kromoszómavesztés röviddel a kariogámia után következik be, ezért nehéz szegregációval a szülői törzsre jellemző szegregánsokat izolálni (Sarachek és munkatársai 1981).

4.10. Kariotipizálás

A kiindulási és a két szülői törzs 8-8 kromoszómával rendelkezik, míg a két hibrid kromoszómaszáma eltérő, nem egyezik sem a szülői törzsekével, sem egymással. A H1M hibrid kromoszómaszáma 12, a H9S hibridé 10?. A kariotipizálás eredménye jól korrelál a flow citométeres méréseknél kapott eredményekkel.

A B C D E M. A B C D E



...ábra A kariotipizálás eredménye.

A: S1, B: M2, C: M4, D: H1M, E: H9S, M: *Saccharomyces cerevisiae* marker

A meiotikus rekombinációval nem rendelkező *Candida albicans*ban a kromoszómális újraszerveződés a genetikai variabilitás fontos alternatív folyamata (Pla és munkatársai 1996). A kromoszómaszám meghatározása pulzáló gélelektroforézissel történik, amely alkalmas a mutációt, szelekciót vagy az rDNS mennyiségi megváltozását követő kromoszómális átrendeződés nyomon követésére (Dewar és munkatársai 1996). A *Candida albicans* diploid gomba, amely nyolc homológ kromoszómapárral rendelkezik, melyek jelölése 1-től (legnagyobb) 7-ig (legkisebb) történik, a nyolcadik az ún. R kromoszóma, amely a riboszómális DNS-t hordozza. Az R kromoszóma kivételével a többi a különböző vizsgálatokban nagymértékű stabilitást mutat (DeBacker és munkatársai 2000).

Kísérletünkben a kiindulási és a szülői telepmorfológiai mutánsok nem mutattak eltérést a kariotípusban. Bár Suzuki és munkatársai (1989) valamint Rutschenko-Bulgac és munkatársai (1990) kimutatták, hogy a telepmorfológiai variáció összefüggésben lehet a kariotípusban talált változásokkal, habár ez a kapcsolat még nem tisztázott. Barton és Scherer (1994) megfigyelték, hogy a telepmorfológiai mutáns törzsük két extra kromoszómával rendelkezett. Nagyszámú, különböző földrajzi helyről valamint AIDS-es betegtől származó *Candida albicans* törzs elemzése azt mutatta, hogy bár vannak eltérések a kariotípusban, a törzsek nagy része azonos kariotípusba tartozott (Clemons és munkatársai 1997, Takasuka és munkatársai 1998).

A protoplaszt fúzió után létrejött hibridjeinknél detektáltunk olyan sávokat, amelyek sem a szülői törzsekben, sem a kiindulási törzsben nem voltak jelen, és extra sávként jelentkeztek. Ugyanakkor a kiindulási és a szülői törzsekben kimutattunk olyan sávokat, melyek mindkét hibridnél hiányoztak. Hasonló eredményeket publikáltak Suzuki és munkatársai (1994). Ennek hátterében a szomatikus hibridizáció után a heterokarionban kialakuló instabilitás állhat, amely a genom átrendeződésén keresztül az aneuploidia különböző szintjeire vezet (Sarachek és Rhoads 1983, Goshorn és Scherer 1989, Sarachek és Weber 1984).

Összefoglalás

1. Összefüggés a *Candida albicans* telepmorfológiája és a sejtípus között:

a.) A *Candida albicans* sima felszínű telepei csak blasztospórát tartalmaztak, míg a rögzös felszínű telepek vagy csak valódi hifa, vagy a blasztospóra és a pszeudohifa különböző arányainak keverékéből álltak.

b.) A protoplasztfúzió után létrejött új, megnyúlt, átmeneti sejtípus, amely a pszeudohifához hasonlított, szintén rögzös telepmorfológiát hozott létre.

2. Az öröklődés vizsgálata:

a.) A sima felszínű és a telepmorfológiai mutánsok - melyek blasztospóra és pszeudohifa keverékéből álltak – között létrehozott sima telepmorfológiájú hibridek azt bizonyítják, hogy a morfo mutációért felelős gének ebben az esetben recesszíven öröklődtek. Ha azonban a telepmorfológiai mutáns valódi hifát képzett, a létrejött hibrid rögzös telepmorfológiájú volt, tehát a gének ebben az esetben domináns módon öröklődtek.

b.) Telepmorfológiai mutánsok – ahol az egyik szülő valódi hifát, a másik blasztospórát és pszeudohifát tartalmazott – között létrehozott hibridek rögzös telepmorfológiájúak voltak, ami arra utalt, hogy komplementáció nem következett be a morfo mutációért felelős gének között. Azonban ennél a fúziónál izoláltunk egyetlen hibridet, amely sima telepeket képzett, tehát itt bekövetkezett a komplementáció.

c.) Ha mindkét telepmorfológiai mutáns szülő blasztospóra és pszeudohifa keverékét tartalmazta, a hibridek sima telepmorfológiával jelentek meg, azt bizonyítva, hogy akomplementáció történt a morfo mutációért felelős gének között.

3. A sejt méretének, alakjának változása

a.) Csak két fúzió (IX-X) esetében tapasztaltunk változást, mind a sejt méretében, mind a sejt alakjában. A létrejött hibrid sejtjeinek átlagos hosszúsága 6 μm volt. Mindkét esetben az egyik szülő valódi hifát képzett.

4. Izoenzim mintázat megváltozása:

a.) A kiindulási és a mutagenézissel létrehozott szülői törzsekben nem volt eltérés az izoenzim mintázatban.

b.) A két hibrid mintázata különbözött egymástól és míg a H9S törzsé megegyezett a szülői mintázattal, addig a H1M törzsé különbözött attól.

5. Változás a kariotípusban:

a.) A kiindulási és a két szülői törzs egyaránt 8-8 kromoszómával rendelkezett, tehát a mutagenézis nem volt hatással a kariotípusra.

b.) A hibridek kromoszómaszáma több volt, mint a szülőké, azonban nem voltak $4n$ kromoszómaszámúak, ami a fúzió után létrejövő genetikai instabilitással magyarázható.

c.) A H1M hibrid kromoszómaszáma nagyobb volt (12), mint a H9S hibridé (11).

6. RAPD-PCR mintázatban jelentkező változások:

a.) A nyolc primer közül öt nem mutatott különbséget a kiindulási és a két szülői típus mintázata között.

b.) A két hibrid mintázata egyetlen esetben sem egyezett meg sem a szülői törzsekével, sem egymással.

c.) Fúzió után a hibridekben a szülői törzseknél nem detektált sávok jelentek meg.

7. Változások a patogenitásban illetve virulenciában:

a.) Minden törzs patogénnek bizonyult, de a virulenciájuk eltérő volt.

b.) Legvirulensebb a csak blasztospórát tartalmazó kiindulási törzs volt.

c.) Legkisebb virulenciával a csak valódi hifát képző telepmorfológiai szülői törzs rendelkezett.

d.) A blasztospórát és pseudohifát tartalmazó telepmorfológiai szülői törzs virulenciája magas volt, de nem érte el a kiindulási törzsét.

e.) A H1M törzs virulenciája az M2, a H9S törzsé az M4 törzs virulenciájához hasonlított.

8. Változások az SDS-PAGE mintázatban:

a.) A legtöbb fehérjesávot az ATCC 10261 törzs adta, a legkevesebbel a H9S törzs rendelkezett.

b.) A két szülői törzs fehérjesávjainak száma azonos volt.

c.) A H1M törzs fehérjesávjainak száma a szülői törzsekéhez volt hasonló.

A *Candida albicans* dimorfizmusának, morfogenezisének, genetikai viselkedésének, a patogén tulajdonság megnyilvánulásának, mint pl.: rezisztencia kifejlődése a különböző antimikotikumokkal szemben, a gazdaszervezet kolonizálásának és a gomba virulencia faktorainak megismerése hozzájárulhat új diagnosztikai metodikák, terápiák és egy esetleges vakcina kifejlesztéséhez.

Függelék

1. Táptalajok

1.1. Szilárd táptalajok

YPD táptalaj (1000 ml-re)

20 g	glükóz	
20 g	pepton	pH 6,5
10 g	élesztőkivonat	
20 g	agar	

Minimál táptalaj (1000 ml-re)

10 g	glükóz	
5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	
2,5 g	KH ₂ PO ₄	pH 6,5
0,5 g	MgSO ₄ x7 H ₂ O	
20 g	agar	
1000 µl	Wickerham féle vitaminoldat	

OSK (1000 ml-re)

10 g	glükóz	
5 g	pepton	pH 6,5
5 g	élesztőkivonat	
44,736 g	KCl	
20 g	agar	

OSM (1000 ml-re)

10 g	glükóz	
5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	
2,5 g	KH ₂ PO ₄	pH 6,5
0,5 g	MgSO ₄ x7 H ₂ O	
44,736 g	KCl	
20 g	agar	

1000 µl Wickerham féle vitaminoldat
OSA (1000 ml-re)
44,736g KCl
15 g agar

1.2. Folyékony tápoldatok

YPD tápoldat

20 g glükóz
20 g pepton
10 g élesztőkivonat

Minimál tápoldat

10 g glükóz
5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
2,5 g KH_2PO_4
0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
1000 µl Wickerham féle vitaminoldat

1.3. Oldatok, pufferek

Wickerham-féle vitaminoldat

0,2 mg folsav
0,2 mg biotin
40 mg Ca-pantotenát
200 mg inozitol
40 mg niacin
20 mg para-aminobenzoésav
20 mg riboflavin
40 mg tiamin
40 mg piridoxin

Előkezelő oldat (100 ml-re)

5 ml 0,2 M Trisz-HCl pH 7,0

0,186 g Na₂EDTA

1 ml β-merkaptóetanol

kiegészítve 100 ml-re desztillált vízzel

Lízis enzim oldat

5 mg/ml Trichoderma Lysing Enzyme 0.6 M KCl-ben oldva

0,6 M KCl oldat (1000 ml-re)

44,736 g KCl

PEG-Ca²⁺ oldat (100 ml-re)

30 ml PEG 6000

4,41 g CaCl₂

0,1 M foszfát puffer pH 7,2

28 ml 0,2 M NaH₂PO₄

72 ml 0,2 M Na₂HPO₄

kiegészítve 400 ml-re desztillált vízzel

0,2 M NaH₂PO₄ oldat (1000 ml-re)

31,202 g NaH₂PO₄x2 H₂O

0,2 M Na₂HPO₄ oldat (1000 ml-re)

71,628 g Na₂HPO₄x12 H₂O

2,5 % glutáraldehid

90 ml 0,1 M foszfát puffer

10 ml 25 % glutáraldehid

2 % Ozmium tetraoxid oldat

0,2 g OsO_4

100 ml desztillált víz

(oldat tárolása sötét üvegben 4 °C-on)

50 mM Na-citrát oldat (100 ml-re)

14,705 g Na-citrát

RN-áz törzsoldat

5 mg/ml RN-áz enzim

Propidium jodid törzsoldat

0,5 mg/ml propidium jodid

Elektród puffer 10x (1000 ml-re)

28,8 g glicin

6 g Trisz pH 8,3

Gél puffer (1000 ml-re)

366 g Trisz pH 6,8 (HCl-val beállítva)

„Stacking” puffer törzsoldat (1000 ml-re)

45,4 g Trisz pH 6,8 (HCl-val beállítva)

Futtató gél törzsoldat (100 ml-re)

39 g akrilamid

1 g bisz-akrilamid

„Stacking” gél törzsoldat (100 ml-re)

38 g akrilamid

2 g bisz-akrilamid

Mintapuffer

30 %	glicerol
0,01 %	brómfenolkék

Extrakciós puffer

0,37 M	Trisz-HCl pH 7,5
1 mM	Na ₂ EDTA
5 mM	β-merkaptoetanol
1 mM	PMSF
1 %	Triton X-100

LETS puffer

0,1 M	LiCl
10 mM	EDTA
10 mM	Trisz-HCl pH 8,0
0,5 %	SDS

TE puffer

10 mM	Trisz-HCl pH 7,5
1 mM	Na ₂ EDTA

TAE puffer 10x (1000 ml-re)

48,4 g	Trisz
11,4 ml	jégecet
20 ml	0,5 M Na ₂ EDTA pH 8,0

Loading puffer

30 %	glicerol
0,25 %	brómfenolkék
0,25 %	xilén-cianol

1.4- Gélek

Futtató gél izoenzim vizsgálatához

18,75 ml	gél puffer pH 8,9
28,84 ml	futtató gél törzsoldat
102 ml	desztillált víz
0,075 ml	TEMED
40 mg	PER

Gyűjtőgél izoenzim vizsgálatához

10 ml	stacking puffer törzsoldat pH 6,8
5,26 ml	stacking gél törzsoldat
34,415 ml	desztillált víz
0,075 ml	TEMED
30 mg	PER

Hivatkozások jegyzéke

- Alex, L. A., Korch, C., Selitrennikoff, C. P. & Simon, M. I. (1998).** *COS1*, a two-component histidine-kinase that is involved in hyphal development in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 7069-7073.
- Al-Rawi, N. & Kavanagh, K. (1998).** A rapid method for the extraction of whole cell proteins from *Candida* species. *J Microbiol Meth* **34**, 107-112.
- Anderson, J. M. & Soll, D. R. (1987).** Unique of opaque cells in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**, 5579-5588 .
- Andrutis, K. A., Riggle, P. J., Kumamoto, C. A. & Tzipori, S. (2000).** Intestinal lesions associated with disseminated in an experimental animal model. *J Clin Microbiol* **38**, 2317-2323.
- Anne, J. & Peberdy, J. F. (1981).** Characterization of interspecific hybrids between *Penicillium chrysogenum* and *P. roqueforti* by iso-enzyme analysis. *Trans Br Mycol Soc* **77**, 401-408.
- Barea, P. L., Calvo, E., Rodriguez, J. A., Rementeria, A., Calcedo, R., Sevilla, M. J., Ponton, J. & Hernando, F. L. (1999).** Characterization of *Candida albicans* antigenic determinants by two-dimensional polyacrylamide ge electrophoresis and enhanced chemoluminescence. *FEMS Imm Med Microbiol* **23**, 343-354.
- Barnes, W. G., Flesher, A., Berger, A. E. & Arnold, J. D. (1971).** Scanning electron microscopic studies of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **106**, 276-280.
- Barnett, J. A., Payne, R. W. & Yarrow, D. (1983).** Yeasts: characteristics and identification. Cambridge University Press, Cambridge.
- Barnett, J. A., Payne, R. W. & Yarrow, D. (2000).** YEASTS: Characteristics and identification. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Barton, R. C. & Sherer, S. (1994).** Induced chromosome rearrangements and morphologic variation in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **176**, 756-763.
- Berg, F. T. (1846).** *Om Torsk hos Barn* L J Herta, Stockholm.
- Bouali, A. Robert, R., Tronchin, G. & Senet, J. M. (1986).** Binding of human fibrinogen to *Candida albicans* in vitro: a preliminary study. *J Med Vet Mycol* **24**, 345-348.

- Bouali, A. Robert, R., Tronchin, G. & Senet, J. M. (1987).** Characterization of binding of human fibrinogen to the surface of germ tubes and mycelium of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **133**, 545-551.
- Brewer, G. J. (1970).** An introduction to isoenzyme techniques. Academic Press. New York.
- Brown, A. J. P. & Gow, N. A. R. (1999).** Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* **7**, 333-338.
- Brown, T. A. (1991).** Molecular Biology. BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford, U. K.
- Buffalo, J., Herman, M. A. & Soll, D. R. (1984).** A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathol* **85**, 21-30.
- Burnie, J. P., Matthews, R. C., Fox, A. & Tabaqchali, S. (1985).** Use of immunoblotting to identify antigenic differences between the yeast and the mycelial phases of *Candida albicans*. *J Clin Pathol* **38**, 701-706.
- Calderone, R. A. & Braun, P. C. (1991).** Adherence and receptor relationship of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* **55**, 1-20.
- Calderone, R. A. & Fonzi, W. A. (2001).** Virulence factors in *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**, 327-335.
- Calderone, R., Suzuli, S, Cannon, R., Cho, T., Boyd, D., Calera, J., Chibana, H., Herman, D., Holmes, A., Jeng, H. W., Kaminishi, H., Matsumoto, T., Mikami, T., O'Sullivan, J. M., Sudoh, M., Suzuki, M., Nakashima, Y., Tanaka, T., Tompkins, G. R. & Watanabe, T. (2000).** *Candida albicans* adherence, signaling and virulence. *Med Mycol* **38**, 125-137.
- Casanova, M., Gil, M. L., Cardenoso, L., Martinez, J. P. & Sentandreu, R. (1989).** Identification of wall-specific antigens synthesized during germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect Immun* **57**, 262-271.
- Caugant, D. A. & sandven, P. (1993).** Epidemiological analysis of *Candida albicans* strains by multilocus enzyme electrophoresis. *J Clin Microbiol* **31**, 215-220.
- Chaffin, W. L. J., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. & Martinez, J. P. (1998).** Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 130-180.
- Clemons, K. V., feroze, F., Holmberg, K. & Stevens D. A. (1997).** Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotypic methods. *J Clin Microbiol* **35**, 1332-1336.

- Cole, M. F., Bowen, W. H., Zhao, X. & Cihlar, R. L. (1995).** Avirulence of *Candida albicans* auxotrophic mutants in a rat model of oropharyngeal candidiasis. *FEMS Microbiol Lett* **126**, 177-180.
- Cutler, J. E. (1991).** Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **45**, 187-218.
- Davis, B. J. (1964).** Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann New York Acad Sci* **121**, 404-423.
- DeBacker, M. D., Magee, P. T. & Pla, J. (2000).** Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **54**, 463-498.
- Dewar, K., Bernier, L. & Lewesque, R. (1996).** Electrophoretic karyotyping in fungi. In: *Non-mammalian genomic analysis: a practical guide*. Academic Press, Inc.
- Diez-Orejas, R., Molero, G., Ríos-Serrano, I., Vazquez, A., Gil, C., Nombela, C. & Sanchez-Perez, M. (1999).** Low virulence of *Candida albicans* mutant. *FEMS Microbiol Lett* **176**, 311-319.
- Dixon, D. M. & Fromtling, R. A. ().** Morphology, taxonomy, and classification of the fungi. In *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. pp. 699-708. Edited by P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover & R. H. Tenover. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Doi, M., Homma, M., Chindamporn, A. & Tanaka, K. (1992).** Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. *J Gen Microbiol* **138**, 2243-2251.
- Dvorak, J. A., Whelan, W. L., McDaniel, J. P., Gibson, C. C. & Kwon-Chung, K. J. (1987).** Flow cytometric analysis of the DNA synthetic cycle of *Candida* species. *Infect Immun* **55**, 1490-1497.
- Ellepola, A. N. B. & Samaranayake, L. P. (1998).** Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. *Arch Oral Biol* **43**, 999-1007.
- Ernst, J. F. (2000).** Transcription factors in *Candida albicans*-environmental control of morphogenesis. *Microbiol* **146**, 1763-1774.
- Ferenczy, L. & Maráz, A. (1977).** Transfer of mitochondria by protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **268**, 524-525.
- Fidel, P. (1999).** *Candida glabrata*: a review of epidemiology, pathogenesis and clinical disease. *Clin Microbiol Rev* **12**, 80-96.

- Fournier, P., Provost, A., Bourguignon, C. & Heslot, H. (1977).** Recombination after protoplast fusion in the yeast *Candida tropicalis*. *Arch Microbiol* **115**, 143-149.
- Fujita, T., Tokunaga, J. & Inoue, H. (1971).** Atlas of scanning electron microscopy in medicine. Igaku Shoin Ltd., Tokyo.
- Ghannoum, M. A. & Abu-Elteen, K. H. (1986).** Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* **24**, 407-413.
- Gil, C., Pomes, R. & Nombela, C. (1988).** A complementation analysis by parasexual recombination of *Candida albicans* morphological mutants. *J Gen Microbiol* **134**, 1587-1595.
- Goshorn, A. K. & Sherer, S. (1989).** Genetic analysis of prototrophic natural variants of *Candida albicans*. *Genetics* **123**, 667-373.
- Gruby, M. (1842).** Recherches anatomiques sur une plant cryptogame qui constitue le vrai muquet des enfants. *C R Acad Sci (Paris)* **14**, 634-636.
- Haussman, D. (1875).** Parasites des organes sexuels femelles de l'homme et de quelques animaux avec une notice sur developpement de l'*Oidium albicans* Robin. J. B. Bailliere, Paris.
- Haynes, K. (2001).** Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol* **9**, 591-596.
- Hazen, K. C., Brawner, D. L., Riesselman, M. H., Jutila, M. A. & Cutler, J. E. (1991).** Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissues. *Infect Immun* **59**, 907-912.
- Hazen, K. C., Lay, J. G. Hazen. B. W., Fu, R. C. G. & Murthy, S. (1990).** Partial biochemical characterization of cell surface hydrophobicity and hydrophilicity of *Candida albicans*. *Infect Immun* **58**, 3469-3476.
- Hippocrates. Epidemics book 3.** Trans. F. Adams 1939. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Hogan, L. H., Klein, B. S. & Levitz, S. M. (1996).** Virulence factors in medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* **9**, 469-488.
- Hostetter, M. K. (1998).** Linkage of adhesion, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *J Lab Clin Med* **132**, 258-263.
- Hubbard, M. J., Markie, D. & Poulter, M. (1986).** Isolation and morphological characterization of a mycelial mutant of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **165**, 61-65.
- Hull, C. M. & Johnson, A. (1999).** Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **285**, 1271-1275.

- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (1990).** PCR protocols. Academic Press. San Diego.
- Jain, P., Khan, Z. K., Bhattacharya, E. & Ranada, S. A. (2001).** Variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles specific to fluconazole-resistant and –sensitive strains of *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Inf Dis* **41**, 113-119.
- Johnson, R. A. (2000).** HIV disease: mucocutaneous fungal infections in HIV disease. *Clin Dermatol* **18**, 411-422.
- Joshi, K. R. & Gavin, J. B. (1975).** The morphology of colony variants of three species of *Candida*. *Sabouraudia* **13**, 274-279.
- Kálmán, É. T., Varga, J. & Kevei, F. (1991).** Characterization of interspecific hybrids within the *Aspergillus nidulans* group by isoenzyme analysis. *Can J Microbiol* **37**, 391-396.
- Kirsch, D. R. & Whitney, R. R. (1991).** Pathogenicity of *Candida albicans* auxotrophic mutants in experimental infections. *Infect Immun* **59**, 3297-3330.
- Kobayashi, G. S. ().** Fungi. In *Microbiology*, 4th ed. pp. 750-765. Edited by B. D. Davis, R. Dulbecco, H. N. Eisen & H. S. J. B. Lippincot Company, Pennsylvania.
- Kobayashi, S. D. & Cutler, J. E. (1998).** *Candida albicans* hyphal formation and virulence: is there a clearly defined role? *Trends Microbiol* **6**, 92-94.
- Köhler, J. R. & Fink, G. R. (1996).** *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc Natl Acad sci USA* **93**, 13223-13228.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the aassembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Langenbeck, B. (1839).** Auffingung von pilzen aus Schleimhaut der speiseröhre einer Typhus-Leiche. *Neue Not Geb Natur-u-Heilk (Froriep)* **12**, 145-147
- Lehmann, P. F., Kemker, B. J., Hsiao, C. B. & Dev, S. (1989).** Isoenzyme biotypes of *Candida* species. *J Clin Microbiol* **27**, 2514-2521.
- Lehmann, P. F., Lin, D. & Lasker, B. A. (1992).** Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida albicans* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol* **30**, 3249-3254.
- Leidich, S. D., Ibrahim, A. S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y. & Ghannoum, M. A. (1998).** Cloning and disruption of *csPLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **273**, 26078-26086.

- Liu, H. (2001).** Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **4**, 728-735.
- Lo, H. J., Köhler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapouti, A. & Fink, G. R. (1997).** Nonfilamentous *Candida albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939-949.
- Matthews, R. & Burnie, J. (1998).** The epidemiology and pathogenesis of candidiasis: applications in prevention and treatment. *Bull Inst Pasteur* **96**, 249-256.
- McCourtie, J. & Douglas, L. J. (1984).** Relationship between cell surface composition, adherence and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* **45**, 6-12.
- McGinnis, M. R. (1980).** Laboratory handbook of medical mycology. Academic Press, New York.
- Meitner, S. W., Bowen, W. H. & Haidaris, C. G. (1990).** Oral and esophageal *Candida albicans* infection in hyposalivatory rat. *Infect Immun* **58**, 2228-2236.
- Mitchell, A. P. (1998).** Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **1**, 687-692.
- Mulvey, M. & Vrijenhoek, R. C. (1981).** Genetic variation among laboratory strains of the planorbis snail *Biomphalaria glabrata*. *Biochem Genet* **19**, 1169-1182.
- Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Nombela, C. & Pla, J. (2001).** Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 245-268.
- Nombela, C., Pomes, R. & Gil, C. (1987).** Protoplast fusion hybrids from *Candida albicans* morphological mutants. *Crit Rev Microbiol* **15**, 79-85.
- Odds, F. C. (1985).** Morphogenesis in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol* **12**, 45-93.
- Odds, F. C. (1988).** *Candida* and candidosis. 2nd ed. Bailliere Tindall, London.
- Odds, F. C. (1994).** *Candida* species and virulence. *ASM News* **60**, 313-318.
- Papp, T., Vágvölgyi, Cs., Kerényi, Z., Nagy, Á. & Michailides, T. J. (1997).** DNA amplification polymorphism of *Mucor piriformis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**, 167-173.
- Payton, M. A. & DeTiani M. (1990).** The isolation of osmotic remedial conditional lethal mutants of *Candida albicans*. *Curr Genet* **17**, 293-296.
- Pesti, M. & Ferenczy, L. (1982).** Protoplast fusion hybrids of *Candida albicans* sterol mutants differing in nystatin resistance. *J Gen Microbiol* **128**, 123-128.
- Pesti, M., Sipiczki, M. & Pintér, Y. (1999).** Scanning electron microscopy characterization of colonies of *Candida albicans* morphological mutants. *J Med Microbiol* **48**, 167-172.

- Pesti, M., Vágvölgyi, Cs., Papp, T., Nagy, Á. & Novák, A. (2001).** Variation of isoenzyme and RSAPD patterns in *Candida albicans* morphological mutants with altered colony ultrastructure. *Acta Biol Hung* **52**, 105-114.
- Pla, J., Gil, C., Monteoliva, L., Navarro-Garcia, F., Sanchez, M. & Nombela, C. (1996).** Understanding *Candida albicans* at the molecular level. *Yeast* **12**, 1677-1702.
- Pomes, R., Gil, C., Cabetas, M. D. & Nombela, C. (1987).** Variability of colonial morphology in benomyl-induced morphological mutants from *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **48**, 255-259.
- Poulain, D., Hopwood, W. & Vernes, A. (1985).** Antigenic variability of *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol* **12**, 223-270.
- Radford, D. R., Challacombe, S. J. & Walter, J. D. (1994).** A scanning electron microscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida albicans*. *J Med Microbiol* **40**, 416-423.
- Radford, D. R., Sweet, S. P., Challacombe, S. J. & Walter, J. D. (1998).** Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J Dentist* **26**, 577-583.
- Reynes, J., Pujol, C., Moreau, c., Mallie, M., Renaud, F., Janbon, F. & Bastide, J. M. (1996).** Simultaneous carriage of *Candida albicans* strains from HIV-infected patients with oral candidiasis: multilocus enzyme electrophoresis analysis. *FEMS Microbiol Lett* **137**, 269-273.
- Riggle, P. J., Andrutis, K. A., Chen, X., Tzipori, S. R. & Kumamoto, C. A. (1999).** Invasive lesions containing filamentous forms produced by *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. *Infect Immun* **67**, 3649-3652.
- Rikkerink, E. H. A., Magee, B. B. & Magee, P. T. (1988).** Opaque-white phenotype transition: a programmed morphological transition in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **170**, 895-899.
- Robert, R., mahaza, C., Marot-leblond, A., Tronchin, G. & Senet, J. M. (1991).** Binding of mouse fibrinogen to *Candida albicans* in vivo. *FEMS Microbiol Lett* **78**, 301-304.
- Rutschenko-Bulgac, E. P., Sherman, F. & Hicks, J. B. (1990).** Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants provide a means for genetic variation of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **172**, 1276-1283.
- Rutschenko-Bulgac, E. P. (1991).** Variations of *Candida albicans* electrophoretic karyotypes. *J Bacteriol* **20**, 6586-6596.

- Riley, J. F. & Riley, N. G. (1990).** *Candida albicans*-do mycelia matter? *J Med Vet Mycol* **28**, 225-239.
- Salfelder, K., Ueda, K., Quiroga, E. L. & Schwarz, J. (1977).** Visceral candidosis. Anatomic study of 34 cases. *Curr Top Pathol* **64**, 177-224.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, New York.
- San-Blas, G., Travassos, L. R., Fries, B. C., Goldman, D. L., Casadevall, A., Carmona, A. K., Barros, T. F., Puccia, R., Hostetter, M. K., Shanks, S. G., Copping, V. M. S., Knox, Y. & Gow, N. A. R. (2000).** Fungal morphogenesis and virulence. *Med Mycol* **38**, 79-86.
- Sanchez-Martinez, C. & Perez-Martin, J. (2001).** Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*-similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol* **4**, 214-221.
- Sarachek, A. & Rhoads, D. D. (1983).** Effects of growth temperatures on plating efficiencies and stabilities of heterokaryons of *Candida albicans*. *Mycopathol* **83**, 181-187.
- Sarachek, A. & Weber, D. A. (1984).** Temperature-dependent internuclear transfer of genetic material in heterokaryosis of *Candida albicans*. *Curr Genet* **8**, 181-187.
- Sarachek, A., Rhoads, D. D. & Schwarzhoff, R. H. (1981).** Hybridization of *Candida albicans* through fusion of protoplasts. *Arch Microbiol* **129**, 1-8.
- Scherer, S. & Magee, P. T. (1990).** Genetics of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* **54**, 226-241.
- Shepherd, M. G. (1985).** Pathogenicity of morphological and auxotrophic mutants of *Candida albicans* in experimental infections. *Infect Immun* **50**, 541-544.
- Shepherd, M. G., Poulter, R. T. M. & Sullivan, P. A. (1985).** *Candida albicans*: biology, genetics and pathogenicity. *Annu rev Microbiol* **39**, 579-614.
- Sherwood, J. Gow, N. A. R., Gooday, G. W., Gregory, D. W. & Marshall, D. (1992).** Contact sensing in *Candida albicans*-a possible aid to epithelial penetration. *J Med Vet Mycol* **30**, 461-469.
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. & Soll, D. R. (1987).** „White-opaque transition”: a second high frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**, 189-197.
- Soll, D. R. (1992).** High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* **5**, 183-203.

- Soll, D. R. (2002).** *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Tropica* **81**, 101-110.
- Soll, D. R., Anderson, J. & Bergen, M. (1991).** The developmental biology of the white-opaque transition in *Candida albicans*. In *Candida albicans-Cellular and molecular biology*. Edited by R. Prasad. Springer-Verlag, Berlin.
- Sonneborn, A., Bockmühl, D. & Ernst, J. F. (1999).** Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* **67**, 5514-5517.
- Steffan, P., Vazquez, J. A., Boikov, D., Xu, C., Sobel, J. D. & Akins, R. A. (1997).** Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA finger-printing of colony lysates. *J Clin Microbiol* **35**, 2031-2039.
- Stoldt, V. R., Sonneborn, A., Lenker, C. E. & Ernst, J. F. (1997).** Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J* **16**, 1982-1991.
- Stöver, A. G., Witek-Janusek, L. & Mathews, H. L. (1998).** A method for flow cytometric analysis of *Candida albicans* DNA. *J Microbiol Meth* **33**, 191-196.
- Sundstrom, P. (1999).** Adhesins in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **2**, 353-357.
- Suzuki, T., Kobayashi, I., Kanbe, T. & Tanaka, K. (1989).** High frequency variation of colony morphology and chromosome reorganization in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **135**, 425-434.
- Suzuki, T., Yamada, M. & Sakaguchi, S. (1994).** Occurrence of chromosome rearrangements during the fusion process in the imperfect yeast *Candida albicans*. *Microbiol* **140**, 3319-3328.
- Takasuka, T., Baily, G. G., Birch, M. Anderson, M. J., Law, D. & Denning, D. W. (1998).** Variation in morphotype, karyotype, and DNA type of fluconazole-resistant *Candida albicans* from an AIDS patient. *J Infect* **36**, 57-62.
- Tzung, K. W., Williams, R. M., Scherer, S., Federspiel, N., Jones, T., Hansen, N., Bivolarevic, V., Huizar, L., Komp, C., Surzycki, R., Tamse, R., Davis, R. W. & Agabian, N. (2001).** Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc natl Acad Sci USA* **98**, 3249-3253.
- Vallin, C. & Ferenczy, L. (1978).** Diploid formation of *Candida tropicalis* via protoplast fusion. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* **25**, 209-212.

- Vanden-Bossche, H., Marichel, P. & Odds, F. C. (1994).** Molecular mechanism of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol* **2**, 393-400.
- Varga, J. & Vágvölgyi, Cs. (1994).** Microbiological, biochemical, genetical and molecular methods used in Lab. 309. Szeged.
- Vediyappen, G., Bikandi, J., Braley, R. & Chaffin, W. L J. (2000).** Ceel surface proteins of *Candida albicans*: preparation of extracts and improved detection of proteins. *Electrophoresis* **21**, 956-961.
- Verduyn Lunel, F. M., Meis, J. F. G. M. & Voss, A. (1999).** Nosocomial fungal infections: candidaemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* **34**, 213-220.
- Watanabe, S., Seki, Y., Shimosuma, M. & Takizawa, K. (1983).** Nail candidiasis. *J dermatol* **10**, 189-203.
- Whiteway, M. (2000).** Transcriptional control of cell type and morphogenesis in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **3**, 582-588.
- Whittaker, D. K. & Drucker, D. B. (1970).** Scanning electron microscopy of intact colonies of microorganisms. *J Bacteriol* **104**, 902-909.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J. & Rafalski, J. A. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res* **18**, 6531-6535.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1991).** Genetic analysis with RAPD markers. In *More Gene Manipulations in fungi*. Academic Press, Inc.
- Woodbury, W., Spencer, A. K. & Stanmann, M. A. (1971).** An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isoenzymes. *Anal Biochem* **44**, 301-305.

